Aus dem Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik
der Freien Universität Berlin

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE WIRKUNG VON BIOGENEN PHOSPHATVERBINDUNGEN AUF DIE FUNKTION VON PROTEINEN AM BEISPIEL DES 2. 3-DIPHOSPHOGLYCERATS UND ADENOSIN-3'-5'-MONO–PHOSPHATS

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
am Fachbereich Chemie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Peter Dietsch
aus Zeulenroda

Berlin 1974

Aus dem Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik
der Freien Universität Berlin

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE WIRKUNG VON BIOGENEN PHOSPHATVERBINDUNGEN AUF DIE FUNKTION VON PROTEINEN AM BEISPIEL DES 2. 3-DIPHOSPHOGLYCERATS UND ADENOSIN-3'-5'-MONO–PHOSPHATS

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
am Fachbereich Chemie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Peter Dietsch
aus Zeulenroda

Berlin 1974

1. Referent: Prof. Dr. Peter Siegmund

2. Referent: Prof. Dr. Georg Manecke

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Letzter Tag der mündlichen Prüfung: 12. 9. 1974

Druck: Der Präsident der Freien Universität Berlin – Zentrale Universitätsdruckerei V aA 4, 1 Berlin 41

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter der Anleitung von Prof. Dr. P. Siegmund im Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik der Freien Universität Berlin durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. P. Siegmund danke ich für die Überlassung des Themas und die Unterstützung dieser Arbeit, in deren Verlauf mir seine Ratschläge eine wertvolle Hilfe waren.

Bei der Durchführung der Versuche haben Frau G. Welge, Frau B. Vasak, Frl. P. Ott und Herr L. Uher geholfen, denen ich dafür danke.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	9
1.1.	Zur Bedeutung des 2.3-DPG	9
1.2.	Die Rolle des cycl. AMP bei der hormonalen Regulation des Stoffwechsels	12
2.	Aufgabenstellung	12
3.	Ergebnisse und Diskussion (Teil I)	17
3.1.	pH-Titrationskurven des 2.3-DPG und Berechnung der Äquivalenzpunkte	17
3.2.	Berechnung der Dissoziations- und Komplexbildungskonstanten	22
3.3.	Vergleich der Komplexbildungskonstanten mit von anderen Autoren angegebenen Werten	28
3.4.	Kalorische Daten	32
3.5.	Einfluß von Magnesiumionen auf die Bindung des 2.3-DPG an Desoxyhämoglobin	37
3.5.1.	Gleichgewichtsdialyse	39
3.5.2.	Sauerstoffbindungskurven	47
3.5.3.	Beobachtung der Magnesiumkonzentration bei der Lagerung von Blutkonserven	58
3.6.	Einfluß von 2.3-DPG und Magnesiumionen auf die Aktivität der Hexokinase	60
3.6.1.	Hefehexokinase	62
3.6.2.	Darstellung von Hexokinase aus Kaninchenerythrozyten	66
3.6.3.	Erythrozytenhexokinase	71

		Seite
4.	Ergebnisse und Diskussion (Teil II)	77
4.1.	Isoenzyme der Carboanhydrase	78
4.2.	Bestimmung der Carboanhydrase durch Messung der CO_2-Hydratation	81
4.3.	Bestimmung der Esteraseaktivität der Carboanhydrase	85
4.4.	Aktivierung der Carboanhydrase in Nierenhomogenaten	88
4.5.	Aktivierung der Carboanhydrase-Isoenzyme	101
5.	Zusammenfassung	103
6.	Experimenteller Teil	
6.1.	Hochspannungselektrophorese von 2.3-DPG	105
6.2.	Überführung des 2.3-DPG-Cyclohexylammoniumsalzes in die freie Säure	105
6.3.	pH-Titrationskurven	106
6.4.	Bestimmung der Reaktionswärmen bei der Komplexbildung von 2.3-DPG mit Erdalkalichloriden	107
6.5.	Von Phosphatverbindungen freie Hämoglobinlösung	108
6.6.	Hämoglobinbestimmung	109
6.7.	Gesamtphosphatbestimmung	109
6.8.	Gleichgewichtsdialyse	110
6.9.	Komplexometrische Magnesiumtitration	111
6.10.	Magnesiumbestimmung im Atom-Absorptions-Spektrophotometer	111
6.11.	Bestimmung von 2.3-DPG durch Aktivierung einer eventuellen Phosphataseaktivität der Phosphoglycerat-Mutase	112
6.12.	Bestimmung von 2.3-DPG als Cofaktor der Phosphoglycerat-Mutase-Reaktion	113
6.13.	Sauerstoffbindungskurven	114
6.14.	Einfluß von Citrat und 2.3-DPG auf die Aktivität von Hefehexokinase bei verschiedenen Magnesiumkonzentrationen	115

Seite

6.15. Hämatologische Methoden 116
6.16. Hexokinase aus Kaninchenerythrozyten 117
6.17. Aktivitätsbestimmung von Erythrozyten-Hexokinase im pH-Stat 119
6.18. Isoenzyme der Carboanhydrase aus Hühnernieren 121
6.19. Aktivitätsbestimmung der Carboanhydrase 123
6.20. Bestimmung der Esteraseaktivität der Carboanhydrase 124
6.21. Darstellung von 2-Hydroxy-α-toluolsulfonsäure-sulton 125
6.22. Darstellung von 2-Hydroxy-5-nitro-α-toluolsulfonsäure-sulton 125
6.23. Aktivierung der Carboanhydrase in Nierenhomogenaten von Hühnern 126
6.24 Aktivierung der isolierten Isoenzyme der Hühnernieren-Carboanhydrase 126
7. Literaturverzeichnis 128

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546512_0020

1. EINLEITUNG

Den Estern der Phosphorsäure kommt im Stoffwechselgeschehen der lebenden Zelle sowie als Bausteinen der Nucleinsäuren eine zentrale Bedeutung zu. Sie sind nicht nur Metabolite bei Synthese und Abbau der wichtigsten Stoffwechselprodukte, sondern oft auch außerordentlich wirksame Effektoren der beteiligten Enzyme.
Zwei Vertreter dieser Verbindungsklasse haben seit einigen Jahren das besondere Interesse der biochemischen Forschung gefunden.
Auf die erste Substanz, das 2.3-Diphosphoglycerat (2.3-DPG), wurde die Aufmerksamkeit besonders dadurch gelenkt, daß sie in den Erythrozyten der meisten Säugetierarten, im Gegensatz zu allen anderen Zellarten, in relativ hohen Konzentrationen bis zu $2 \cdot 10^{-2}$ M vorkommt. Um fünf Zehnerpotenzen geringer, nämlich durchschnittlich $1 \cdot 10^{-7}$ M, ist demgegenüber die Konzentration der zweiten Verbindung, die in den verschiedensten Zellarten nachgewiesen werden konnte. Es handelt sich dabei um einen cyclischen Phosphorsäureester, das Adenosin-3′-5′-monophosphat (cycl. AMP).

1.1. Zur Bedeutung des 2.3-DPG

2.3-DPG wurde erstmalig von Greenwald (1) im Jahre 1925 aus Schweine-Erythrozyten isoliert, ohne daß es zu diesem Zeitpunkt möglich war für das Auftreten dieser Verbindung in den sauerstofftransportierenden roten Blutzellen eine Erklärung zu geben.
Rapoport und Mitarbeiter haben sich eingehend mit dem Stoffwechsel der Erythrozyten beschäftigt. Sie konnten 1951 den Weg aufzeigen, auf dem 2.3-DPG gebildet wird (2) und bestimmten 1955 (3), daß so gut wie 90% der Glucose in den Erythrozyten in 2.3-DPG überführt werden. (Abb. 1)
Erst 37 Jahre nach seiner Entdeckung wurde durch die Arbeiten von Benesch und Benesch (4) sowie Chanutin und Curnish (5) deutlich,

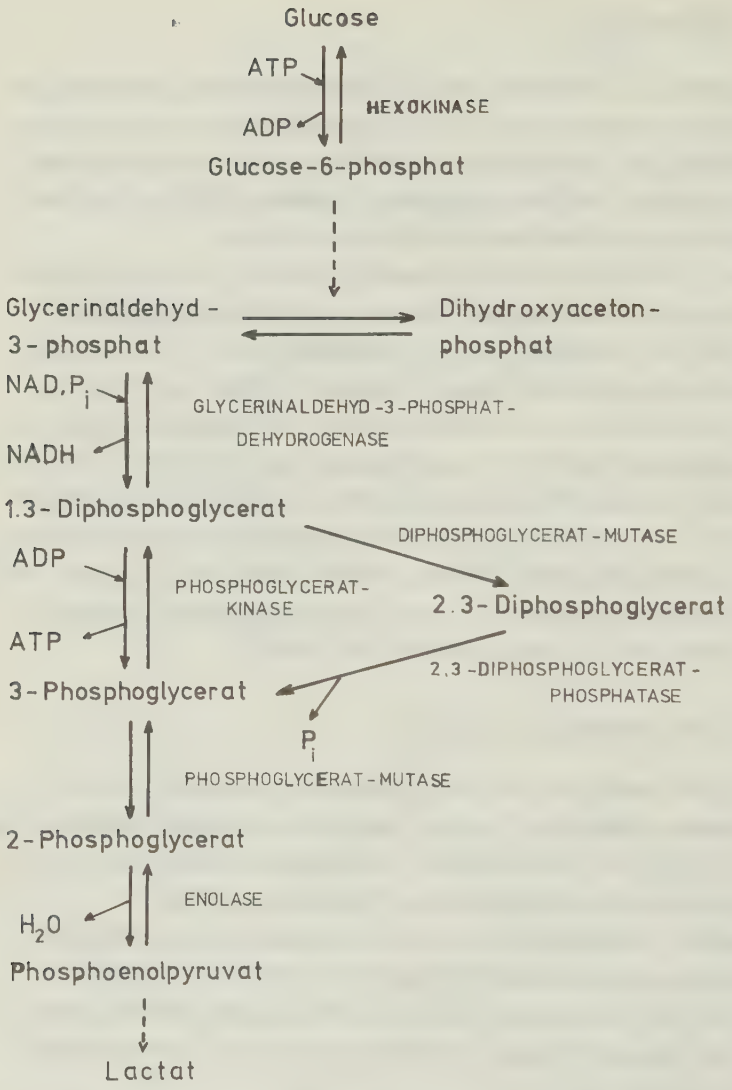


Abb. 1:
Verkürztes Schema der Glykolyse in Erythrozyten

welche Bedeutung das 2. 3-DPG für die Funktion der Erythrozyten hat. Beide berichteten 1967, daß 2. 3-DPG an menschliches Desoxyhämoglobin gebunden wird und sich dabei die Affinität des Hämoglobins für Sauerstoff dramatisch verringert. Und zwar erniedrigen 2. 3-DPG und Adenosin-5'-triphosphat (ATP) in den Konzentrationen, wie sie in den roten Blutkörperchen enthalten sind, die Sauerstoffaffinität auf ein Dreißigstel (6). Sie erleichtern auf diese Weise die Abgabe des Sauerstoffs vom Hämoglobin an das Gewebe. In den Erythrozyten von Bergbewohnern ist die Konzentration des 2. 3-DPG deutlich größer und die Sauerstoffbindungskurve ist nach rechts verschoben. Bereits nach 6 Stunden ist, wie Lenfant et al. (7) zeigen konnten, eine erhöhte 2. 3-DPG-Konzentration bei Personen zu beobachten, die in größere Höhen gebracht wurden. Daraus ist zu schließen, daß ein Mechanismus existieren muß, der die 2. 3-DPG-Konzentration in Abhängigkeit von der Sauerstoffbeladung des Hämoglobins reguliert. Nach Rapoport (8) fungieren auch in den Erythrozyten die beiden Phosphotransferasen Hexokinase und Phosphofruktokinase als hauptsächliche Kontrollenzyme der Glykolyse. Von diesen hat die Hexokinase die niedrigste Enzymaktivität aller Glykolyseenzyme. In intakten Zellen wird jedoch eine noch geringere Glykolyserate beobachtet, was bedeutet, daß die Hexokinase unter strikter Kontrolle stehen muß (9, 10). Obwohl de Verdier und Garby (11) keinen Effekt von 2. 3-DPG auf Erythrozytenhexokinase fanden, konnte Brewer (12) zeigen, daß 2. 3-DPG die Aktivität der Hexokinase in Hämolysaten erniedrigt und wie bei einer ATP-abhängigen Reaktion zu erwarten, ein Einfluß von ATP und Magnesium existiert. Es ist dazu jedoch zu bemerken, daß diese Ergebnisse auf photometrischen Messungen beruhen, bei denen Δ E/Min. -Werte von nur 0, 0005 bis 0, 002 bestimmt wurden. Ob sich so geringe Extinktionsänderungen mit dem benutzten Beckman Spektralphotometer DU exakt messen lassen, muß bezweifelt werden. Über die Bindung des 2. 3-DPG an das Hämoglobin finden sich in der Literatur keine einheitlichen Anschauungen. Während Benesch und Mitarbeiter fanden, daß ein Mol 2. 3-DPG pro Mol Hämoglobin nur in der Desoxy-Form gebunden wird (4, 6) und auch Bunn et al. (13) davon ausgehen, beschreiben Chanutin und Herman (14) ebenso wie Garby et al.

(15) eine Bindung des 2.3-DPG auch an Oxyhämoglobin mit geringerer Assoziationskonstante und finden wenigstens drei Bindungsstellen. Aus der Kenntnis der Struktur des Oxy- und Desoxyhämoglobins konnte Perutz (16) zeigen, wie das 2.3-DPG zwischen die beiden ß-Ketten gebunden werden kann und dabei die Quartärstruktur des Desoxyhämoglobins stabilisiert.

1.2. Die Rolle des cycl. AMP bei der hormonalen Regulation des Stoffwechsels

Unsere heutige Kenntnis über die Bedeutung des cycl. AMP ist eng verbunden mit den Arbeiten von Sutherland und Mitarbeitern, deren Untersuchungen über die Wirkung von Adrenalin und Glucagon 1957 ergaben (17), daß die Hormonantwort in Leberhomogenaten in zwei Phasen abläuft. Zunächst wird in Gegenwart des Hormons ein aktiver Faktor gebildet, der ein geringes Molekulargewicht besitzt und verhältnismäßig hitzestabil ist. Dieser besorgt dann die Aktivierung von Leberphosphorylase im Überstand von Homogenaten, in denen das Hormon selbst keinen Einfluß hat. Lipkin und Mitarbeiter konnten 1959 die Struktur dieser Verbindung als cycl. AMP aufklären (18). Nachdem weitere Wirkungen des cycl. AMP bekannt waren, formulierten Sutherland und Robison 1966 (19) in Form des "second messenger"-Prinzips ein allgemeines Schema für die Wirkung zahlreicher Polypeptidhormone und Amine (Abb. 2). Die Aktivierung von Enzymen ist jedoch nicht die einzige Wirkung des cycl. AMP, sondern es sind heute mehr als 30 durch das cycl. AMP ausgelöste Effekte auf die verschiedensten Gewebe und Organismen bekannt (20).

2. AUFGABENSTELLUNG

Bereits 1962 (21) und 1963 (22) hat Siegmund darauf hingewiesen, daß 2.3-DPG in der Lage ist, Calcium- und Magnesiumionen komplex zu binden und hat Stabilitätskonstanten für diese Komplexe angegeben. Fraglos müssen sich die Eigenschaften des freien 2.3-DPG von denen

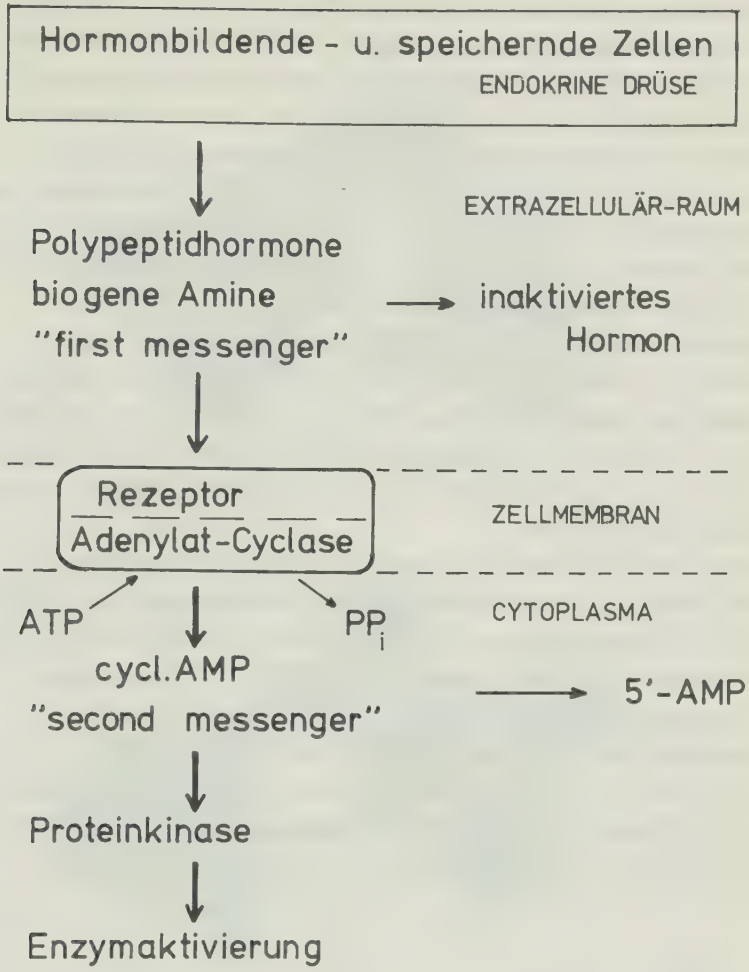


Abb. 2.

"second messenger"-Prinzip der Wirkung zahlreicher Polypeptidhormone und Amine. Das als extrazellulärer "first messenger" dienende Hormon steigert die Bildung von cycl. AMP durch die membrangebundene Adenylat-Cyclase. Cycl. AMP aktiviert als intrazellulärer "second messenger" eine Proteinkinase.

des Magnesiumkomplexes unterscheiden. Bei der Komplexbildung verschwinden zwei negative Ladungen, und wie die Atomkalottenmodelle nach Stuart und Briegleb zeigen (Abb. 3), ist auch die sterische Anordnung des Moleküls anders. Abb. 4, die nach den Angaben von Perutz (16) gezeichnet wurde, zeigt die wahrscheinliche Bindungsstelle am Hämoglobin mit dem eingezeichneten 2.3-DPG-Molekül. Bedenkt man, daß die Zelle ca. 3 mMol/l Magnesium enthält, so wird in Verbindung mit Abb. 3 deutlich, daß das nicht ohne Wirkung auf die einleitend beschriebenen Reaktionen sein kann.

Aufgabe des ersten Teils der vorliegenden Arbeit war es daher, zunächst die Komplexbildung des 2.3-DPG mit Erdalkaliionen mit den heute zur Verfügung stehenden Mitteln zu untersuchen, um im weiteren Verlauf den Einfluß des Magnesiums auf die Bindung des 2.3-DPG an Hämoglobin sowie die Wirkung auf die Aktivität der Erythrozyten-Hexokinase zu bestimmen.

Der zweite Teil der Arbeit resultiert aus einer Zusammenarbeit mit M. Holke, die in vivo die Wirkung von Parathormon und cycl. AMP auf die Aktivität der Carboanhydrase in Nieren von Ratten und Hühnern untersuchte (23, 24). Hierbei gelang es uns, zwei Isoenzyme der Carboanhydrase aus Hühnernieren zu isolieren und zu zeigen, wie sich ihre Aktivitäten nach Parathormonwirkung verändern. (vgl. Abb. 26 und 27). Darüber hinaus war nun zu versuchen, diese Befunde durch in vitro-Versuche zu untermauern und weitere Hinweise auf die Wirkung des cycl. AMP zu finden.

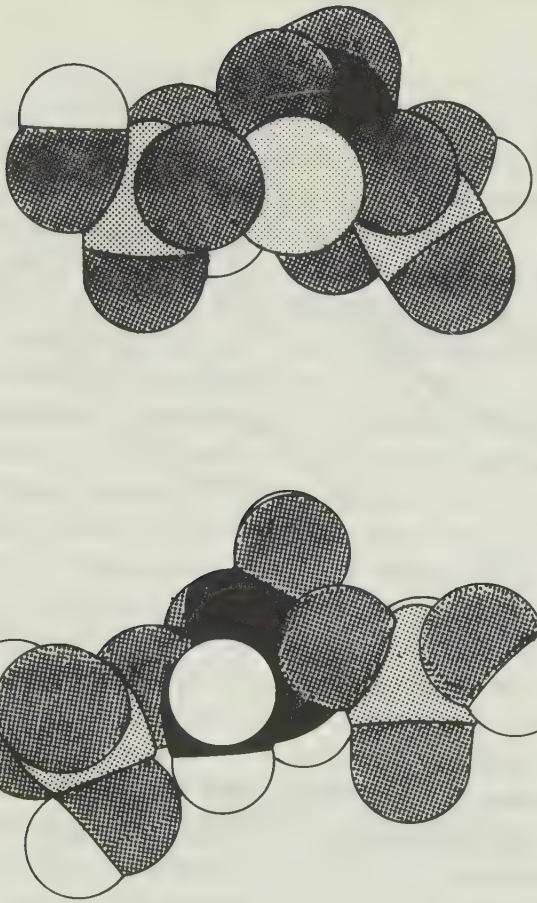


Abb. 3:

Atomkalottenmodell (nach Stuart und Briegleb) eines 2. 3-Diphosphoglycerat -Komplexes (oben) sowie der freien Säure

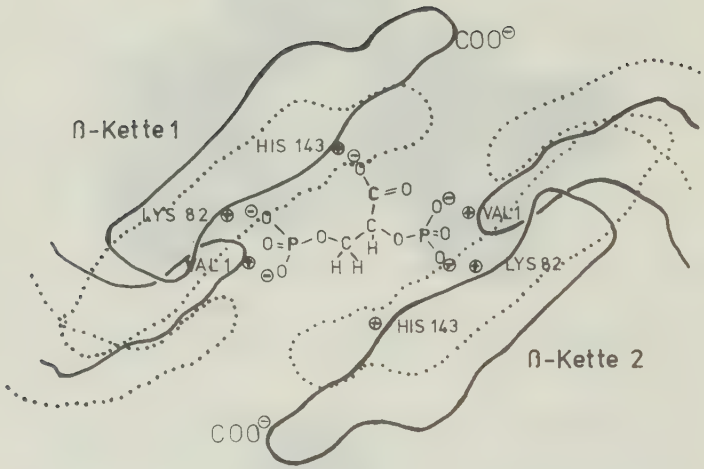


Abb. 4:

Bindungsmöglichkeiten für das 2.3-DPG innerhalb des "central cavity" zwischen den beiden ß-Ketten.
Desoxyhämoglobin, Oxyhämoglobin
(nach Perutz)

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION (Teil I)

3.1. pH-Titrationskurven des 2.3-DPG und Berechnung der Äquivalenzpunkte

Da die Durchführung einer Hochspannungselektrophorese zeigte, daß das im Handel erhältliche 2.3-DPG-Cyclohexylammoniumsalz keine anderen Phosphorsäurederivate enthielt, konnte es ohne weitere Reinigung verwendet werden. Es wurde über eine Kationenaustauschersäule in die freie Säure überführt.

Bei der Aufnahme der Titrationskurven wurde für konstante Temperatur von 25,0° C gesorgt und auf Ausschluß von Kohlendioxid der Luft geachtet. Das pH-Meter, ein batteriebetriebenes Kompensationsgerät, das eine Ablesung auf 0,001 pH-Werte erlaubte, wurde vor jeder Messung geeicht. Da die Elektrodenanordnung gegen äußere Einflüsse zusätzlich abgeschirmt war, ergab sich in Verbindung mit dem netzunabhängigen Betrieb eine sehr stabile Anzeige. Es wurden ca. 10 µMol der Säure eingesetzt und die Titration erfolgte jeweils in 0,1 M Natriumchlorid mit 0,1 N Natronlauge, in 0,1 M Kaliumchlorid mit 0,1 N Kalilauge bzw. in 0,1 M Tetramethylammoniumbromid mit 0,1 N Tetramethylammoniumhydroxid in Schritten von 10 µl. Zur Ermittlung der Komplexbildungskonstanten wurden sogenannte Überschußkurven in Gegenwart von Kaliumchlorid und Tetramethylammoniumbromid aufgenommen, bei denen die Lösungen 0,01 M an Magnesiumchlorid, Calciumchlorid bzw. Strontiumnitrat waren. Jede Kurve wurde wenigstens zweimal bestimmt; die Abb. 5 und 6 geben die Ergebnisse wieder.

Man erkennt zwei gut ausgeprägte Wendepunkte, die der Neutralisation von 3 bzw. 5 Protonen entsprechen. Zur Bestimmung der zugehörigen ul verbrauchten Titrationsmittels wurde die von Wolf (25) angegebene Näherungsgleichung benutzt. Das gesuchte Volumen v_o ist danach

$$v_o = v_{c_o} + \rho \cdot \Delta_v, \text{ wenn } v_{c_o} - v_{c_1} > 0 \quad \text{und}$$

$$v_o = v_{c_o} - \rho \cdot \Delta_v, \text{ wenn } v_{c_o} - v_{c_1} < 0 \quad \text{ist.}$$

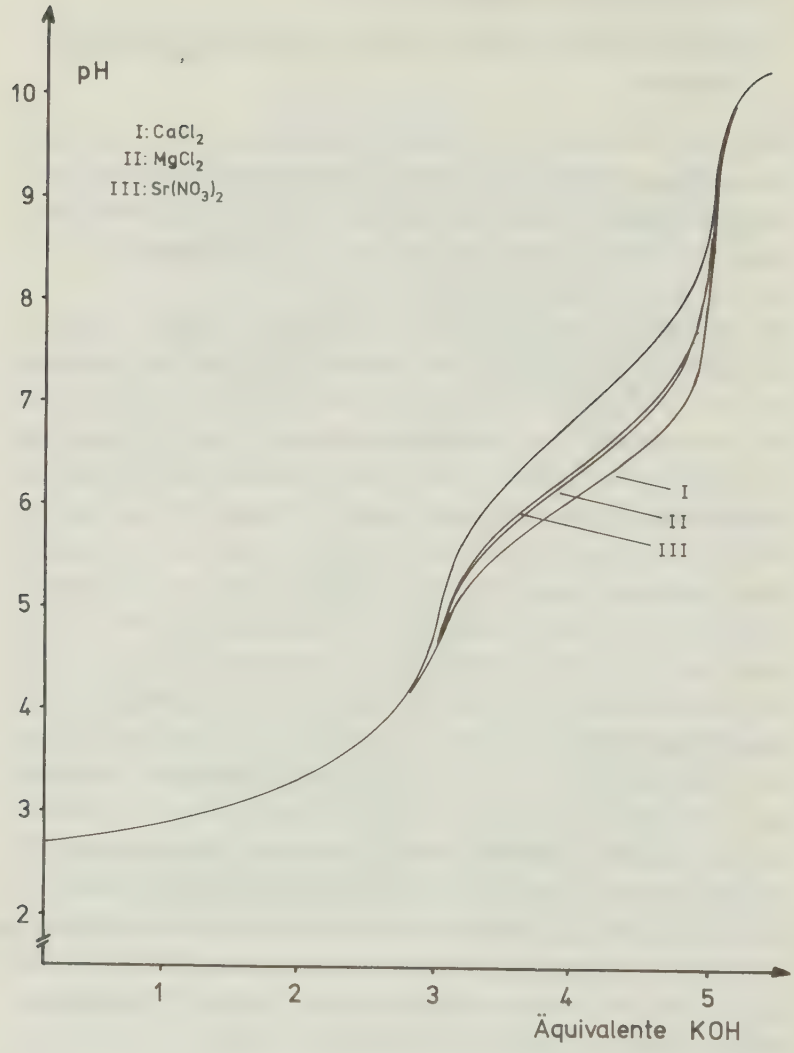


Abb. 5:

Titrationskurve von 2.3-Diphosphoglycerinsäure in 0,1 M KCl und Überschußkurven

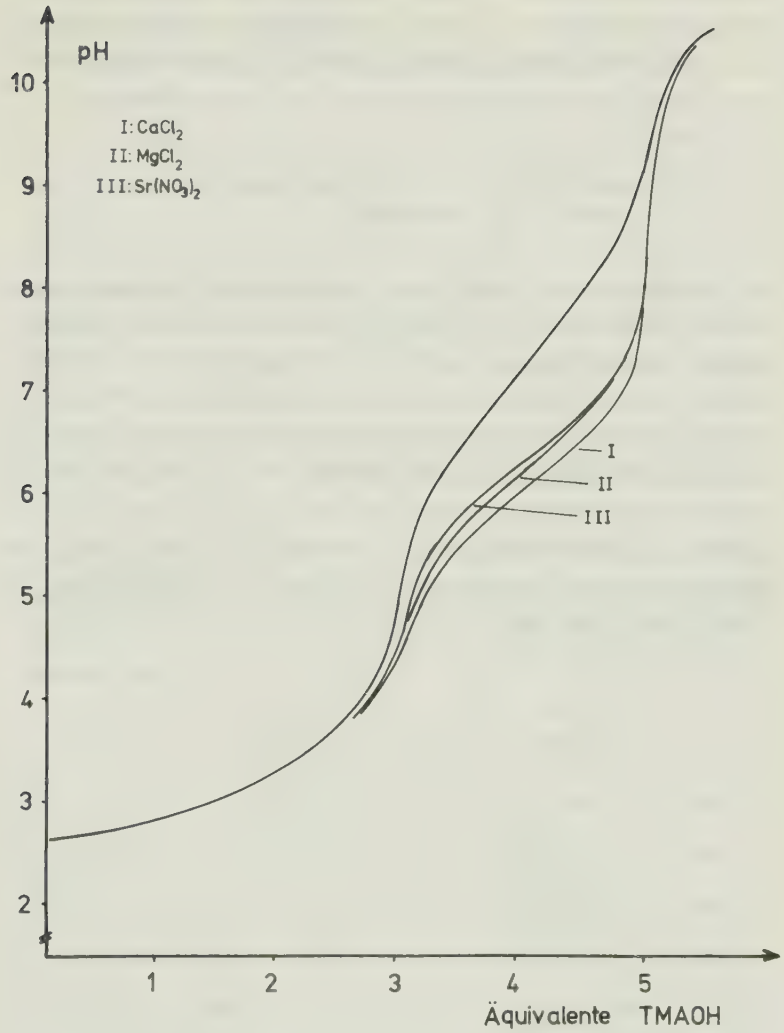


Abb. 6:

Titrationskurve von 2. 3-Diphosphoglycerinsäure in 0, 1 M TMABr und Überschußkurven

Hierin bedeuten v_{c_0} das Volumen des Titrationsmittels bis zur größten Potentialdifferenz Δ_0 und v_{c_1} das Volumen des Titrationsmittels bis zur zweitgrößten Potentialdifferenz Δ_1. Die drittgrößte Potential- oder hier pH-Differenz zwischen zwei Volumenschritten Δ_v ist Δ_2.

$\rho = 0,5 \cdot R_2 - 0,2 \cdot R_1^2$, worin

$R_1 = \frac{\Delta 1}{\Delta_0}$ und $R_2 \frac{\Delta 2}{\Delta 1}$ bedeuten.

Zur Berechnung dieser Werte und für alle weiteren Rechnungen wurde ein programmierbarer Tischrechner Diehl Combitron S mit Dilector benutzt, der zehn Speicher besitzt, die wahlweise entweder 12 Programmschritte oder eine Konstante aufnehmen können. Die Programmierung gestaltet sich bei diesem Rechner relativ einfach, da man keinen besonderen Programmiercode benötigt. Sie sei in diesem Falle etwas ausführlicher dargelegt; später sollen nur noch die fertigen Programme angegeben werden. Das hier betrachtete Problem konnte, da die Combitron S eine Entscheidung < 0 oder > 0 treffen kann, folgendermaßen gelöst werden:

0,2 ≍ 8 ; 0,5 ≍ 9

P0	(Δ_0) # ≍ 7 (Δ_1) # ≍ 6 : ≍ 7 =	A
P1	≍ 7 (Δ_2) # : ≍ 6 = ≍ 6 ≍ 9	A
P2	x ≍ 6 5 ≍ 7 x = x ≍ 8 5	A
P3	(v_{c_0}) # ≍ 7 + (v_{c_1}) # -* CJ 5 5*	A
P4	x (Δ_v) # = + ≍ 7 + * # J O	A
P5	5* x (Δ_v) # = - ≍ 7 + * #	A

Das Belegungsschema zeigt, daß damit der Rechner an der Grenze seiner Speicherkapazität angelangt ist:

Programm u. Konstantenspeicher										Saldier-Ergebnis-speicher			
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	+	-	5	$\underline{5}$
P	P	P	P	P	P	K	K	K	K	*		$\overset{**}{5}$	
						Δ_1	Δ_0	0,2	0,5	v_{c_o}		ρ	
						R_2	R_1			v_{c_1}			
							v_{c_o}			v_o			

Das fertige Programm wird von dem Rechner in Form eines Zahlencodes ausgegeben, der entweder von Hand, oder aber nach der Übertragung auf einen Lochstreifen mit dem Dilector wieder eingegeben werden kann:

```
4 7 5 6 5 0 6 4,7 4 3 4 1 3 8 3   ≈ 0
2 0 8 3 5 7 6 6,5 9 4 9 9 9 1 4   ≈ 1
8 1 6 4 8 0 8 3,9 6 4 5 8 5 3 4   ≈ 2
4 7 5 6 5 1 4 8,2 8 0 6 2 0 6 0   ≈ 3
8 3 4 5 1 5 0 8,8 6 9 2 8 6 5 9   ≈ 4
3 5 6 9 7 7 7 4,1 8 7 4 3 2 6 6   ≈ 5
                  0,0 0 0 0 0   ≈ 6
                  0,0 0 0 0 0   ≈ 7
                  0,2 0 0 0 0   ≈ 8
                  0,5 0 0 0 0   ≈ 9
```

Eingegeben werden Δ_0, Δ_1, Δ_2, v_{c_o}, v_{c_1} und Δ_V in dieser Reihenfolge; der Rechner druckt v_o aus, das zur Berechnung der genauen Konzentration des 2.3-DPG im Titrationsansatz benutzt wurde.

3.2 Berechnung der Dissoziations- und Komplexbildungskonstanten +)

Betrachtet man die in den Abb. 4 und 5 wiedergegebenen Titrationskurven des 2.3-DPG, so sieht man, daß eine Komplexbildung nur im Bereich zwischen den beiden Wendepunkten eintritt, was sich an der Verschiebung der Kurve zu sauren pH-Werten zu erkennen gibt. Dieser Bereich entspricht der Existenz des einfach protonierten Anions H-2.3-DPG^{4-} und des völlig deprotonierten Säureanions 2.3-DPG^{5-}. Es ist dabei weiter zu sehen, daß die Existenzbereiche dieser beiden Anionen nicht von einander zu trennen sind. Vielmehr muß davon ausgegangen werden, daß beide über einen relativ breiten pH-Bereich nebeneinander vorliegen. Dies gibt sich in den Titrationskurven dadurch zu

---

+) Die hier benutzten Symbole entsprechen der von G. Schwarzenbach verwendeten Nomenklatur.

Säuredissoziationskonstanten:

$$K^{H}_{H_2Z} = \frac{[\text{H-2.3-DPG}^{4-}] \cdot [H^+]}{[\text{H}_2\text{-2.3-DPG}^{3-}]}$$

$$K^{H}_{HZ} = \frac{[\text{2.3-DPG}^{5-}] \cdot [H^+]}{[\text{H-2.3-DPG}^{4-}]}$$

$$-\log K^{H}_{H_2Z} = pK_4$$

$$-\log K^{H}_{HZ} = pK_5 \text{ . oder allgemein } pK_S$$

pK_S ist der negative Logarithmus der scheinbaren Dissoziationskonstanten der Säure in Gegenwart eines Überschusses des Metallkations.

Stabilitätskonstanten:

$$K^{M}_{MHZ} = \frac{[\text{MH-2.3-DPG}^{2-}]}{[\text{H-2.3-DPG}^{4-}] \cdot [M^{2+}]}$$

$$K^{M}_{MZ} = \frac{[\text{M-2.3-DPG}^{3-}]}{[\text{2.3-DPG}^{5-}] \cdot [M^{2+}]}$$

erkennen, daß die beiden Puffergebiete, die der Abgabe des vierten und fünften Protons entsprechen, nicht durch einen Wendepunkt von einander getrennt sind. Daher lassen sich auch die Säuredissoziationskonstanten nicht direkt aus den Kurven entnehmen. Sie sind aber mit Hilfe der von Schwarzenbach (26) angegebenen Gleichung für eine derartige Titrationskurve zu berechnen.

$$\sum_{j=o}^{n} (g - 1) \cdot [H^+]^j \cdot K^H_{H_jZ} = 0 \qquad (1)$$

Im Falle des 2.3-DPG interessieren, wie gezeigt, nur die Dissoziationskonstanten des vierten und fünften Protons $K^H_{H_2Z}$ und K^H_{HZ}. Damit nimmt Gleichung (1) eine relativ einfache Form an, in der sie sich mit Hilfe von zweistelligen Determinanten lösen läßt.

$$g \cdot \frac{1}{K^H_{HZ}} + (g - 2) \cdot [H^+]^2 \cdot K^H_{H_2Z} = -(g - 1) \cdot [H^+] \qquad (2)$$

Setzt man $g = a_1$, $(g - 2) \cdot [H^+]^2 = a_2$ und $-(g - 1) \cdot [H^+] = b$, so ist nach der Cramerschen Regel:

$$D = \begin{vmatrix} a_{11} & a_{12} \\ a_{21} & a_{22} \end{vmatrix} = a_{11}a_{22} - a_{12}a_{21}$$

$$D_1 = \begin{vmatrix} b_1 & a_{12} \\ b_2 & a_{22} \end{vmatrix} = b_1a_{22} - a_{12}b_2$$

$$D_2 = \begin{vmatrix} a_{11} & b_1 \\ a_{21} & b_2 \end{vmatrix} = a_{11}b_2 - b_1a_{21}$$

und $\frac{1}{K^H_{HZ}} = \frac{D_1}{D}$

sowie $K^H_{H_2Z} = \frac{D_2}{D}$

g bezeichnet den wahren Assoziationsgrad und gibt die Zahl der Protonen an, die durchschnittlich pro Mol 2.3-DPG gebunden erscheinen. Er leitet sich aus der dem gerade betrachteten pH-Wert zugehörigen Anzahl Mole Titrationsmittel a ab, die pro Mol 2.3-DPG zugegeben sind. Unter Berücksichtigung des Ionenproduktes des Wassers ergibt sich die folgende Gleichung:

$$g = m - a + \frac{[OH^-] - [H^+]}{[Z]_t}$$

m ist die Anzahl der maximal abdissoziierbaren Protonen bzw. Koordinationsstellen des 2.3-DPG, dessen Gesamtkonzentration mit $[Z]_t$ bezeichnet ist. Für die Gleichung (2) erhält man aus n Wertepaaren von g und $[H^+]$ n - 1 Lösungen. Zur Bestimmung von $K^H_{H_2Z}$ wurden jeweils nur die ersten drei viertel der ermittelten Wertepaare herangezogen, da im Bereich zwischen pK_5 und dem zweiten Wendepunkt praktisch kaum noch ein Einfluß von $K^H_{H_2Z}$ auf den Verlauf der Titrationskurve angenommen werden kann.
Damit werden die Lösungen der Gleichung (2) für $K^H_{H_2Z}$ in diesem Bereich immer ungenauer. Entsprechend wurden zur Ermittlung von K^H_{HZ} nur die letzten drei viertel der zwischen den beiden Wendepunkten liegenden Wertepaare herangezogen. Auf diese Weise wurden jeweils wenigstens 20 Werte für die beiden Dissoziationskonstanten berechnet und daraus die Mittelwerte und ihr mittlerer Fehler bestimmt.

Die Berechnung wurde wieder mit der Combitron S ausgeführt, was aber wegen der zu geringen Speicherkapazität nur in mehreren Teilschritten möglich war. Die erste Aufgabe war die Umrechnung der ermittelten pH-Werte in Wasserstoffionenkonzentrationen, wozu das Programm Nr. 100100 y = ln x von Diehl nur um den Faktor 2,302585 erweitert zu werden brauchte.

```
4 2 2 3 8 4 7 0 1 4,6 7 6 5 4 8   ↙ 0
1 2 3 3 9 8 6 2 9 7,8 9 9 5 1 6   ↙ 1
8 1 6 7 0 0 4 1 4 3,6 6 2 6 8 2   ↙ 2
  6 0 7 9 8 5 9 4 9,6 9 5 0 1 7   ↙ 3
2 7 7 5 6 8 4 8 4 0,2 5 1 3 0 7   ↙ 4
                  0,0 0 0 0 0 0   ↙ 5
                  0,0 0 0 0 0 0   ↙ 6
                  2,3 0 2 5 8 5   ↙ 7
                  0,0 0 0 0 0 0   ↙ 8
                  1,0 0 0 0 0 0   ↙ 9
```

Die Aufstellung eines Programms für die Berechnung von g machte ebenfalls keine Schwierigkeiten. m und $[Z]_t$, das nach Abschnitt 3.1. berechnet wurde, kommen in die Speicher 8 und 9. Es werden a, $[OH^-]$ und $[H^+]$ nacheinander eingegeben.

```
1 2 0 8 6 8 6 5 5 1,6 9 6 8 4 0   ↙ 0
4 8 3 1 7 8 5 7 6 3,3 7 7 9 8 3   ↙ 1
4 9 8 2 1 0 7 0 8 7,7 7 8 6 1 2   ↙ 2
4 2 2 3 0 2 2 7 3 1,7 5 7 4 0 8   ↙ 3
                  0,0 0 0 0 0 0   ↙ 4
                  0,0 0 0 0 0 0   ↙ 5
                  0,0 0 0 0 0 0   ↙ 6
                  0,0 0 0 0 0 0   ↙ 7
                  0,0 0 0 0 0 0   ↙ 8
                  0,0 0 0 0 0 0   ↙ 9
```

Nun können die Werte für $(g - 1)\cdot[H^+]$ und $(g - 2)\cdot[H^+]^2$ mit dem nebenstehenden Programm berechnet werden. (g und $[H^+]$ sind nacheinander einzugeben). Da der Rechner nur 16 Stellen und 8 Kommastellen drucken kann, wurden die Werte von $[H^+]$ zuvor mit 10^4 multipliziert, damit bei den höheren pH-Werten noch genügend Ziffern ausgerechnet werden.

```
4 6 0 7 8 3 8 6 4 0,5 8 6 9 4 7   ↙ 0
4 7 5 6 4 7 3 8 6 9,2 9 2 0 5 8   ↙ 1
6 5 2 8 1 1 3 9 6 3,9 6 9 3 5 9   ↙ 2
                  0,0 0 0 0 0 0   ↙ 3
                  0,0 0 0 0 0 0   ↙ 4
                  0,0 0 0 0 0 0   ↙ 5
                  0,0 0 0 0 0 0   ↙ 6
                  0,0 0 0 0 0 0   ↙ 7
                  1,0 0 0 0 0 0   ↙ 8
                  2,0 0 0 0 0 0   ↙ 9
```

	In 0,1 M TMABr		In 0,1 M KCl	
	pK_4	pK_5	pK_4	pK_5
H^+	6,476 ± 0,008	7,968 ± 0,005	6,200 ± 0,013	7,367 ± 0,013
Mg^{2+}	5,788 ± 0,012	6,759 ± 0,005	5,802 ± 0,006	6,707 ± 0,008
Ca^{2+}	5,649 ± 0,008	6,472 ± 0,008	5,605 ± 0,015	6,457 ± 0,019
Sr^{2+}	5,953 ± 0,004	6,722 ± 0,006	5,823 ± 0,008	6,673 ± 0,009

Tabelle 1

pK_S und pK_S' Werte des 2.3-DPG in Gegenwart verschiedener divalenter Kationen bei 25°. Metallionenkonzentration 0,01 M, 2.3-DPG-Konzentration ca. 0,001 M

Zur eigentlichen Berechnung der Gleichung (2) konnte nach diesen Vorarbeiten das Programm Nr. 10 003 von Diehl verwendet werden.

```
4 7 5 6 6 4 1 4 9 1, 3 7 0 5 8 1   x 0
2 0 8 3 5 4 6 9 9 5, 7 9 4 6 2 7   x 1
2 6 1 1 1 0 8 0 4 3, 8 0 0 8 9 2   x 2
1 2 1 4 3 1 4 6 7 3, 1 4 6 4 3 8   x 3
8 8 0 7 5 7 1 9 5 8, 6 6 5 4 9 2   x 4
1 1 9 3 1 4 3 6 3 1, 2 2 9 1 2 4   x 5
                    0, 0 0 0 0 0 0 x 6
                    0, 0 0 0 0 0 0 x 7
                    0, 0 0 0 0 0 0 x 8
                    0, 0 0 0 0 0 0 x 9
```

Zur Mittelwerts- und Fehlerberechnung wurde das Programm Nr. 10 328 von Diehl um den mittleren Fehler des Mittelwertes erweitert und hatte damit folgende Form:

```
4 7 7 0 3 8 0 6 4 4, 4 2 1 8 3 8   x 0
1 0 3 1 1 0 6 7 0 8, 9 0 8 1 1 4   x 1
4 4 1 6 6 1 0 1 6 3, 6 9 0 5 1 1   x 2
8 1 6 8 2 4 1 3 8 4, 8 3 5 4 6 2   x 3
8 8 1 8 6 8 0 2 2 8, 9 3 6 7 4 2   x 4
1 1 6 5 4 5 7 4 1 1, 7 6 2 5 1 8   x 5
                    0, 0 0 0 0 0 0 x 8
                    0, 0 0 0 0 0 0 x 9
```

Die in Gegenwart eines genügenden Überschusses des komplex zu bindenden Kations aufgenommenen Titrationskurven wurden auf die gleiche Weise behandelt. Die daraus errechneten pK_S' - Werte sind kleiner als die pK_S - Werte, da in diesen Fällen Wasserstoff- und Metallionen um die Bindung am Säureanion konkurrieren und dadurch die Dissoziation der Protonen erleichtert wird. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 1. Aus der Differenz der pK_S - und pK_S' - Werte kann man nach Schwarzenbach (26) die Logarithmen der Stabilitätskonstanten nach folgender Gleichung berechnen:

$$\log K = pK_S - pK_S' - pM,$$

wobei pM der negative dekadische Logarithmus der Konzentration des betreffenden Erdalkalimetallions ist. Er kann bei genügendem Überschuß des Metallions während der Titration als konstant angesehen werden. Tabelle 2 enthält die so gewonnenen Stabilitätskonstanten und Logarithmen der Stabilitätskonstanten der Erdalkalimetallkomplexe des 2.3-DPG. Wie man sieht, sind die Konstanten größer, die in Gegenwart des Tetramethylammoniumbromids bestimmt wurden. Das liegt daran, daß Kaliumionen, wenn auch nur geringfügig, komplex gebunden werden können, während das große Tetramethylammoniumion keine Komplexe mit dem 2.3-DPG bildet. Daher ließen sich nach Bestimmung der pK_s-Werte in 0,1 M Natriumchlorid auch die Stabilitätskonstanten der schwachen Assoziate von Kalium- und Natriumionen mit dem 2.3-DPG aus der Differenz der pK_s- Werte in Kalium- bzw. Natriumchlorid einerseits und Tetramethylammoniumbromid andererseits berechnen.

$$\log K = pK_5 \; - \; pK_{5(KCl)} \; - \; \log \; [K^+]$$

Tabelle 3 zeigt die so bestimmten Assoziationskonstanten.

3.3. Vergleich der Komplexbildungskonstanten mit von anderen Autoren angegebenen Werten

Mit der Komplexbildung von 2.3-DPG mit Magnesiumionen haben sich inzwischen auch einige andere Autoren beschäftigt. Bis auf die letzte der anzuführenden Veröffentlichungen wurden aber jeweils nur Bruttokonstanten ermittelt, bei denen verschiedene Ionenstärken und Unterschiede der pH-Werte, bei welchen sie ermittelt wurden, einen Vergleich erschweren. Die eigenen Ergebnisse waren 1971 (27) Teil eines Kurzreferats auf dem 7. FEBS-Kongreß und wurden 1972 zusammen mit kalorischen Daten veröffentlicht (28). Zu Beginn der Untersuchungen lag neben den Angaben von Siegmund (21) nur ein Wert für die Bildungskonstante des Magnesiumkomplexes von $1,1 \cdot 10^3 \; M^{-1}$ vor, den Rose

M^{2+}	K^M_{ZHM}	K^M_{ZM}	log K^M_{ZHM}	log K^M_{ZM}
Mg^{2+}	388 ± 12	1618 ± 26	2,588 ± 0,014	3,209 ± 0,007
Ca^{2+}	672 ± 17	3134 ± 65	2,827 ± 0,011	3,496 ± 0,009
Sr^{2+}	334 ± 7	1762 ± 33	2,523 ± 0,009	3,246 ± 0,008

a) bei 25° C in o,1 M TMABr

M^{2+}	K^M_{ZHM}	K^M_{ZM}	log K^M_{ZHM}	log K^M_{ZM}
Mg^{2+}	250 ± 8	457 ± 16	2,398 ± 0,014	2,660 ± 0,015
Ca^{2+}	394 ± 18	814 ± 43	2,595 ± 0,020	2,910 ± 0,023
Sr^{2+}	238 ± 8	495 ± 18	2,377 ± 0,015	2,694 ± 0,018

b) bei 25° C in 0,1 M KCl

Tabelle 2: Stabilitätskonstanten und Logarithmen der Stabilitätskonstanten der Erdalkalimetallkomplexe des 2.3-DPG und die zugehörigen mittleren Fehler des Mittelwerts.

	$\log K^{M}_{ZHM}$	$\log K^{M}_{ZM}$
Na^+	1,124 ± 0,017	1,444 ± 0,013
K^+	1,267 ± 0,015	1,601 ± 0,014

Tabelle 3:
Logarithmen der Bildungskonstanten der Assoziate von Na^+ und K^+ an 2,3-Diphosphoglycerat bei 25° und ihre mittleren Fehler des Mittelwertes.

1968 mit Hilfe einer Ionenaustauscher-Konkurrenzmethode in 0,1 M Kaliumchlorid bei pH 7,5 bestimmt hatte (29). Collier und Lam (30) haben 1970 aus spektroskopischen Daten bei pH 7,55 und einer Ionenstärke $\mu = 0,13$ für den Magnesiumkomplex eine Stabilitätskonstante von $695 \pm 94\ M^{-1}$ und mit Hilfe einer Elektrode, die spezifisch auf zweiwertige Kationen anspricht, einen Wert von $670 \pm 178\ M^{-1}$ erhalten. Rose (nach 31) findet mit Hilfe einer indirekten enzymatischen Methode, dem scheinbaren Einfluß von Magnesiumionen auf die Michaelis-Konstante der 2,3-DPG-Phosphatase bei pH 7,5 und $\mu = 0,1$, einen Wert von $430\ M^{-1}$. 1971 veröffentlichten Bunn und Mitarbeiter (13) eine Stabilitätskonstante für den Magnesiumkomplex von $400 \pm 89\ M^{-1}$ bei pH 7,3 und $\mu = 0,1$, auf den sie aus Sauerstoffbindungskurven des Hämoglobins schließen. Zum Vergleich können die Werte der Tabelle 2b) herangezogen werden, die zwischen $250\ M^{-1}$ für K^{M}_{MHZ} und $457\ M^{-1}$ für K^{M}_{MZ} liegen. Da die pH-Werte, bei denen die aufgeführten Stabilitätskonstanten bestimmt wurden, näher bei pK_5 liegen, sollten auch diese Konstanten eher den Wert 457 als 250 haben und es sollte die bei pH 7,3 erhaltene Konstante den kleineren Wert besitzen, was auch der Fall ist. Kurz nach Veröffentlichung der hier beschriebenen Ergebnisse teilten Achilles und Mitarbeiter (32) Komplexbildungskonstanten für die Natrium-, Kalium- und Magnesiumkomplexe mit, die

ebenfalls aus Titrationskurven unter Verwendung eines viel umfangreicheren Computer-Programms berechnet wurden (Tabelle 4).

	$\log K^{M}_{ZHM}$	$\log K^{M}_{ZM}$
Na^+	0,95	1,93
K^+	0,98	1,93
Mg^{2+}	2,71	3,87
$\log K^{Mg}_{ZMg_2} = 2,25$!		

Tabelle 4:

Stabilitätskonstanten von Metallkomplexen des 2.3-Diphosphoglycerats bei 37° C und $\mu = 0,15$ in Tetramethylammoniumbromid nach Achilles et al.(32)

Sie geben auch die Stabilitätskonstante eines Mg_2-2.3-DPG-Komplexes an, dessen Existenz jedoch bezweifelt werden muß. So finden sich bei Achilles auch leider keine Angaben über eine mögliche Struktur dieses 2 : 1 Komplexes. Es ist daher anzunehmen, daß eine solche Verbindung die Struktur eines Di-Magnesiumsalzes des 2.3-DPG besitzt (vgl. auch Abb. 3). Ob dies der Grund dafür ist, daß die von Achilles und Mitarbeitern angegebenen Werte größer als die hier bestimmten sind, läßt sich aus den zur Verfügung stehenden Daten nicht entscheiden. Es muß aber berücksichtigt werden, daß Achilles und Mitarbeiter ihre Titrationskurven bei 37° C aufnahmen. Da die Reaktionsenthalpie bei der Bildung des nicht protonierten Komplexes bekannt ist (vgl. Abschnitt 3.4.), kann mit Hilfe der van't Hoffschen Gleichung

$$\frac{d \ln K}{dt} = \frac{\Delta H'}{RT^2}$$ in der integrierten Form

$$\Delta \log K = \log K_{310} - \log K_{298} = \frac{\Delta H}{2,303\,R} \left(\frac{1}{298} - \frac{1}{310} \right)$$

Δ log K zu 0,18 errechnet werden. Da Δ H positiv ist, müßte zwar die Komplexbildungskonstante bei 37° C um diesen Betrag größer sein, das reicht jedoch noch nicht aus, um die Differenz zu erklären.

Bei der Berechnung der Titrationskurve mit Gleichung (2) und den Werten der Tabelle 2 konnte erwartungsgemäß die experimentell bestimmte Titrationskurve wiedererhalten werden. Das zeigt, daß sich die Titrationskurve des 2.3-DPG in Gegenwart der Erdalkaliionen durchaus unter Verwendung von nur zwei Konstanten exakt darstellen läßt.

3.4. Kalorische Daten

Das zur Bestimmung der Reaktionsenthalpien bei der Komplexbildung benutzte Kalorimeter (Microcalorimeter Modell 190 B der Fa. Beckman) ist ein "batch typ", bei dem der Wärmefluß aus dem Reaktionsgefäß in einen Aluminiumblock durch eine große Anzahl von Thermoelementen gemessen wird. Dieses Thermopile ist durch eine dicke Isolierung geschützt und befindet sich in einem auf den gewünschten Wert $\pm$ 0,1° temperierbaren Kasten. Die benutzten Reaktionsgefäße bestehen aus zwei ineinander steckenden sehr dünnwandigen Glasrohren, die genau in das Thermopile passen, so daß der Abstand der Lösung vom Thermopile nirgends größer als etwa 4 mm ist. Sie besitzen zwei kleine Einbuchtungen, die zur Aufnahme von maximal 300 µl Lösung dienen; in den Zwischenraum können etwa 15 ml eingefüllt werden (Abb. 7). Es werden jeweils zwei solcher Reaktionsgefäße eingesetzt, wobei der Apparat die Differenz der Wärmeabgabe oder

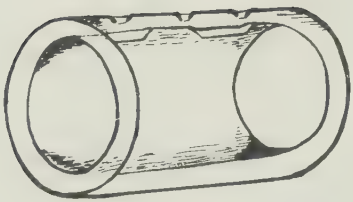


Abb. 7:
Reaktionsgefäß für Beckman Microcalorimeter 190 B

-Aufnahme zwischen beiden Gefäßen mißt. Man verfährt so, daß man den Reaktionspartner, der in die Einbuchtungen kommt, in beide Gefäße gibt und eliminiert damit dessen Verdünnungswärme, da sie in beiden Gefäßen entsteht. Der zweite Reaktionspartner kommt in den Hauptraum des Reaktionsgefäßes. Nach Temperaturausgleich werden durch Drehen des Thermopiles die Lösungen vermischt und damit die Reaktion gestartet. Nach entsprechender Verstärkung wird die Thermopilespannung auf einem Schreiber gegen die Zeit ausgegeben, der mit einem Disc-Chart-Integrator ausgestattet ist. Die Fläche unter der Kurve ist proportional der aufgenommenen bzw. abgegebenen Wärmemenge. Einen typischen Verlauf gibt Abb. 8 wieder. Die später erscheinenden kleinen Schreiberausschläge rühren von erneutem Drehen des Thermopiles her; man sieht daraus, ob beim ersten Mal vollständige Mischung erreicht wurde und kann die durch die Bewegung der Lösung entstandenen, sehr geringen Wärmen von den bei der Reaktion gemessenen abziehen.

Das Kalorimeter wurde geeicht durch die Messung der Neutralisationswärme von Salzsäure und die Bestimmung der einer mcal entsprechen-

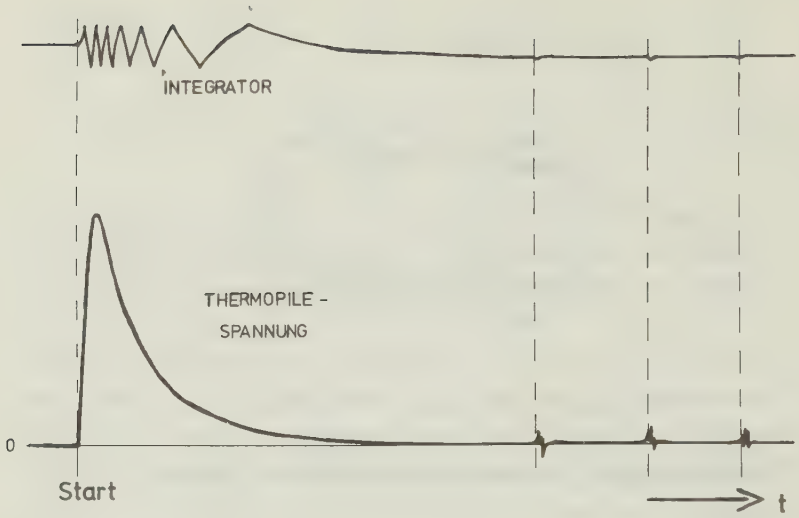


Abb. 8:
Beispiel für ein Schreiber-Diagramm eines Experimentes im Microcalorimeter

den Anzahl von Integratoreinheiten.

Die Reaktionsenthalpien sind positiv, das bedeutet, daß bei der Komplexbildung Wassermoleküle der Hydrathülle freigesetzt werden und die Enthalpie der Hydratbildung bei den Komponenten (2.3-DPG und Metallion) negativer sein muß als die Enthalpie der Komplexbildung aus den wasserfreien Komponenten. Die thermodynamischen Daten für die Bildung der nicht protonierten Komplexe sind in Tabelle 5 zusammengefaßt. Eine direkte Korrelation von Stabilitätskonstanten und Reaktionsenthalpien ist möglich, da Temperatur und Konzentrationen bei den Messungen entsprechend gewählt worden waren. Aus den Stabilitätskonstanten wurden die freien Standard-Enthalpien und aus diesen und den Δ H-Werten die Entropien für die Bildung der 2.3-DPG-

Me^{2+}	log K	$\Delta G \frac{kcal}{Mol}$	$\Delta H \frac{kcal}{Mol}$	$\Delta S \frac{cal}{Mol \cdot Grad}$
Mg^{2+}	3,209	- 4,377	+6,44	32,8
Ca^{2+}	3,496	- 4,768	+ 5,85	35,6
Sr^{2+}	3,248	- 4,427	+ 3,98	38,2

a) bei 25^{o} C in 0,1 M TMABr

Me^{2+}	log K	$\Delta G \frac{kcal}{Mol}$	$\Delta H \frac{kcal}{Mol}$	$\Delta S \frac{cal}{Mol \cdot Grad}$
Mg^{2+}	2,660	- 3,628	+ 5,37	30,2
Ca^{2+}	2,910	- 3,969	+ 5,20	30,8
Sr^{2+}	2,694	- 3,674	+ 3,63	24,5

b) bei 25^{o} C in 0,1 M KCl

Tabelle 5:

Thermodynamische Daten der Reaktion 2.3-DPG^{5-} + Me^{2+} $\rightleftharpoons$ [Me · 2.3-DPG]$^{3-}$

Komplexe aus den entsprechenden Ionen berechnet. Bunn und Mitarbeiter (31) schlossen aus der Temperaturunabhängigkeit der von ihnen ermittelten Komplexbildungskonstante auf eine Reaktionsenthalpie von 0 bei der Komplexbildung von 2.3-DPG mit Magnesiumionen. Das stimmt jedoch mit den direkten Messungen der Reaktionsenthalpie keineswegs überein und relativiert damit auch den angegebenen Wert für die Komplexbildungskonstante. Die recht großen Werte der Reaktionsentropien zeigen, daß die Stabilität der 2.3-DPG-Komplexe durch die Bildungswahrscheinlichkeit bedingt ist und weniger durch die Stärke der Bindung zwischen Metallion und Ligand. Durch das fünffach negativ geladene Anion des 2.3-DPG wird eine starke Orientierung der umgebenden Wassermoleküle verursacht. Bei der Komplexbildung werden zwei dieser Ladungen von denen des Kations neutralisiert und das 2.3-DPG-Anion wird aus seiner gestreckten Anordnung zum Metallion hin gebogen (Abb. 3). So verschwindet teilweise die Wirkung auf die Wassermoleküle der Umgebung, was seinen Ausdruck in den positiven Werten für die Entropie findet. Auffällig sind die verhältnismäßig geringen Unterschiede der Komplexbildungskonstanten mit den drei untersuchten Erdalkaliionen. Speziell bei der Bildung des Strontiumkomplexes wird die geringere Reaktionsentropie durch eine weniger positive Enthalpie fast kompensiert. Mit dem 2.3-DPG können nur dreizahnige Komplexe entstehen (Abb. 3), wobei es zur Ausbildung siebengliedriger Ringe kommt. Das bedeutet, daß kein Chelateffekt - Schwarzenbach (33) - zur Stabilität dieser Komplexe beiträgt. Dies wird deutlich bei dem Vergleich mit den von Anderegg (34) ermittelten Werten der entsprechenden Komplexe des Tripolyphosphats (Tabelle 6). Auch hier werden die Metallkationen in dreizahnigen Komplexen an ein fünffach negativ geladenes Anion über Sauerstoffatome gebunden. Die größere auch durch die Entropie bedingte Stabilität dieser Erdalkalikomplexe ist wahrscheinlich auf den hier vorhandenen Chelateffekt (es bilden sich sechsgliedrige Ringe) zurückzuführen. Die ΔH-Werte haben für beide Komplexbildner sehr ähnliche Werte.

Me^{2+}	log K	$\Delta G \frac{kcal}{Mol}$	$\Delta H \frac{kcal}{Mol}$	$\Delta S \frac{cal}{Mol \cdot Grad}$
Mg^{2+}	7,05	- 9,45	4,34	47,0
Ca^{2+}	6,31	- 8,45	3,30	40,0
Sr^{2+}	5,46	- 7,31	3,16	35,7

Tabelle 6:

Thermodynamische Daten der Reaktion
Me + Tripolyphosphat $\rightleftharpoons$ [Me · Tripolyphosphat]
bei 20° in Tetramethylammoniumnitrat ($\mu = 0,1$)
nach G. Anderegg (34)

3.5 Einfluß von Magnesiumionen auf die Bindung des 2.3-DPG an Desoxyhämoglobin

Wie einleitend (Abschnitt 2) bereits dargelegt, ist auf Grund der Komplexbildung des 2.3-DPG ein deutlicher Einfluß von Magnesiumionen auf die Bindung des 2.3-DPG an das Hämoglobin und damit auf seine sauerstoffbindenden Eigenschaften zu erwarten. Es war also zu prüfen, ob das 2.3-DPG überwiegend als solches oder aber auch in nennenswertem Maße als Magnesiumkomplex an das Desoxyhämoglobin gebunden wird. Eine Aussage darüber war aus einer Gleichgewichtsdialyse zu erwarten, bei der das eine Kompartiment Hämoglobin, 2.3-DPG und Magnesium enthielt, während sich in dem zweiten nur 2.3-DPG und Magnesium befanden. Da durch die Dialysemembran zwar die kleinen Moleküle 2.3-DPG und Magnesium diffundieren können, das Hämoglobin aber zurückgehalten wird, würde eine Veränderung der Ausgangskonzentrationen Rückschlüsse auf die Reaktion zulassen.

Über die bei diesen Versuchen erzielten Ergebnisse ist ebenfalls auf dem 7. FEBS-Meeting, Varna 1971, von uns berichtet worden (27). Da im Falle, daß das 2.3-DPG nicht als Komplex an das Hämoglobin gebunden wird, eine Konkurrenz zwischen Magnesiumionen und Hämoglobin um das 2.3-DPG zu erwarten ist, sollte die Konzentration des Magnesiums auch einen Einfluß auf die Bindung des Sauerstoffs an das Hämoglobin haben. Um das nachzuweisen waren Sauerstoffbindungskurven ohne und mit 2.3-DPG bei verschiedenen Magnesiumkonzentrationen aufzunehmen.

Das für diese Untersuchungen benutzte Hämoglobin wurde durch Hämolyse jeweils frisch gewonnener menschlicher Erythrozyten erhalten. Da mehr als 95 % des im Cytoplasma von Erythrozyten enthaltenen Proteins Hämoglobin ist, war eine weitere Anreicherung oder Reinigung nicht notwendig. Die Hämoglobinlösung wurde durch Gelfiltration an Sephadex G 25 von niedermolekularen Bestandteilen (hauptsächlich dem 2.3-DPG) befreit, wie dies Benesch und Mitarbeiter (6) beschrieben. Zur Bestimmung der Hämoglobinkonzentration wurde nach Oxydation mit Kaliumhexacyanoferrat-III die Extinktion des Hämiglobincyanids bei 546 nm gemessen (64). Bei einer Aufarbeitung wurde die Konzentration des verbliebenen Gesamt-Phosphats nach der Methode von Bartlett (35) bestimmt. Sie betrug nach der Gelfiltration noch 30 µM und entspräche damit, berechnet als 2.3-DPG, einem molaren Verhältnis von 2.3-DPG zu Hämoglobin von 0,025 : 1.

Die bei den folgenden Versuchen benutzten Hämoglobinlösungen wurden mit 2-[Bis-(2-hydroxyäthyl)-imino]-2-hydroxymethyl-1.3-propandiol gepuffert (Bis-Tris-Puffer). Diese Substanz wurde für Versuche mit Hämoglobin erstmals von Benesch und Mitarbeitern (41) verwendet. Sie besitzt Vorteile gegenüber anderen Puffersubstanzen (wie z.B. Phosphat), die sonst in dem infragekommenden pH-Bereich benutzt werden. Da angenommen werden muß, daß andere kleine Anionen mit dem 2.3-DPG um die Bindung am Hämoglobin konkurrieren können und dadurch die Ergebnisse verfälschen, mußte der be-

nutzte Puffer ein relativ großes Molekül und möglichst wenig geladen sein. Das Bis-Tris erfüllt diese Forderungen; es hat ein hohes Molekulargewicht und besitzt einen pK_s-Wert von 6,5. Es ist damit bei pH 7,4, bei dem die Versuche durchgeführt wurden, kaum geladen, hat aber dabei noch eine genügende Pufferwirkung.

3.5.1. Gleichgewichtsdialyse

Die Dialyseanordnung zeigt Abb. 9. In einem Reagenzglas mit Schliff befand sich ein Dialysierschlauch, der mit einer Lösung von ca. 0,5 mM 2.3-DPG und ca. 0,5 mM Magnesiumchlorid in 10 mM Bis-Tris-Puffer, pH 7,4, gefüllt war. Die Lösung außerhalb des Dialysierschlauches war außerdem 0,5 mM an Hämoglobin. Der Dreiweghahn diente dazu, um nach dem Evakuieren nachgereinigten Stickstoff in die Apparatur zu lassen. Damit herrschte in der Apparatur wieder Atmosphärendruck und es konnte vermieden werden, daß durch eventuell auftretende Undichtigkeiten Sauerstoff mit dem desoxygenierten Hämoglobin reagierte. Eine Gasblase in dem Hahnansatz war zur guten Durchmischung notwendig. Wie ein Vorversuch zeigte, war es sehr wichtig, eine große Oberfläche zu schaffen, um die Sauerstoffabgabe in einer angemessenen Zeit zu erreichen. Dazu wurde die Dialyseanordnung nach dem Evakuieren mehrmals völlig umgeschwenkt und das Evakuieren dreimal wiederholt. Um für einen ausreichend schnellen Konzentrationsausgleich auch im Inneren des Dialysierschlauches zu sorgen, wurde in diesen eine passende Glasperle mit hineingegeben. Zur Erleichterung der Sauerstoffabgabe befand sich die Hämoglobinlösung außerhalb des Dialysierschlauches. Die Dialyseanordnung blieb so etwa eine Woche in der Kühlkammer bei 0° C stehen, wobei öfters umgeschwenkt wurde. Anschließend wurden die 2.3-DPG- und Magnesiumkonzentrationen in der inneren und äußeren Lösung bestimmt.

Zur quantitativen Erfassung des 2.3-DPG boten sich neben der Möglichkeit der Veraschung und Bestimmung des Phosphats zwei Reaktionswege an, die sich aus Abb. 1 erkennen lassen. Das 2.3-DPG er-

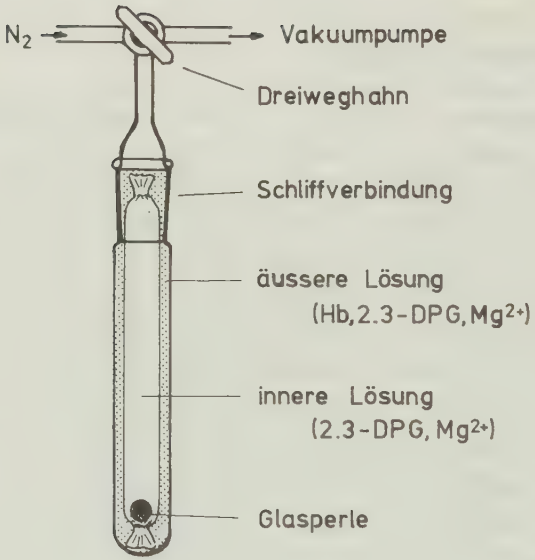


Abb. 9:
Versuchsanordnung zur Gleichgewichtsdialyse

scheint darin einmal als Substrat der 2.3-Diphosphoglycerat-Phosphatase und zum anderen als Cosubstrat der Phosphoglycerat-Mutase. Von diesen beiden Reaktionen ausgehend waren Reaktionsfolgen möglich, die schließlich zur stöchiometrischen Verknüpfung mit den im UV-Licht absorbierenden Substanzen NADH und Phosphoenolpyruvat führten.

Rose und Liebowitz schlugen 1970 vor (36), eine 2.3-Diphosphoglycerat-Phosphatase-Aktivität, die in Handelspräparaten von Phosphoglycerat-Mutase als Fremdaktivität stets vorhanden sein sollte, zur Bestimmung des 2.3-DPG zu benutzen, nachdem sie festgestellt hatten, daß sich diese durch Pyrophosphat und besonders - etwa um das tausendfache - durch 2-Phosphoglykolat aktivieren ließ. Darauf wurde der folgende Reaktionsweg beschritten:

$$\text{2.3-DPG} \xrightleftharpoons{\text{2.3-DPG-Phosphatase}} \text{3-PG} + P_i$$

$$\text{3-PG} + \text{ATP} \xrightleftharpoons{\text{Phosphoglycerat-Kinase}} \text{1.3-DPG} + \text{ADP}$$

$$\text{1.3-DPG} + \text{NADH} \xrightleftharpoons{\text{Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase}} \text{GAP} + \text{NAD} + P_i$$

So konnte die Phosphatabspaltung vom 2.3-DPG über die Phosphoglycerat-Kinase-Reaktion mit der NADH-abhängigen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-Reaktion verknüpft und durch Bestimmung der Extinktionsabnahme bei 366 nm oder 340 nm im Photometer verfolgt werden. Obwohl diese Endpunktsmethode große Vorteile bietet, da sie nicht von äußeren Einflüssen, wie etwa Temperatur und Konzentration anderer Verbindungen abhängig ist, konnte sie nicht zur Konzentrationsbestimmung verwendet werden. Leider war in der bei Boehringer erhältlichen Phosphoglycerat-Mutase-Präparation eine nennenswerte 2.3-Diphosphoglycerat-Phosphatase-Aktivität nicht nachzuweisen. Auch eine Verzehnfachung der Phosphoglycerat-Mutase-Konzentration brachte nur eine Extinktionsänderung pro Minute von 0,001. Um auszuschließen, daß dieses negative Ergebnis an einer

der Folgereaktionen lag, wurde 3-Phosphoglycerat zum Ansatz gegeben. Dabei wurde eine äquivalente Menge NADH umgesetzt und die Reaktion war unter den angegebenen Bedingungen (Abschnitt 6.11.) nach 6 Minuten zum Stillstand gekommen.

Die Aktivierung der Phosphoglycerat-Mutase durch 2.3-DPG benutzte J. Krimsky (37) zur 2.3-DPG-Bestimmung. Die hier angegebene Vorschrift folgt einer Mitteilung aus dem Forschungslabor der Fa. Boehringer, Tutzingen, bei der einige Konzentrationsangaben geändert wurden. Der Reaktionsverlauf ist folgender:

$$PEP + H_2O \xrightleftharpoons{\text{Enolase}} 3\text{-PG}$$

$$3\text{-PG} \xrightleftharpoons[\text{2.3-DPG}]{\text{Phosphoglycerat-Mutase}} 2\text{-PG}$$

Zur photometrischen Bestimmung eignete sich dabei das Absorptionsmaximum des Phosphoenolpyruvats bei 240 nm, dessen Abnahme mit der Zeit ein Maß für die Konzentration des 2.3-DPG war. Da es sich dabei um die Beeinflussung der Reaktionsgeschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion handelte, mußte besonders darauf geachtet werden, daß die Parameter bei der 2.3-DPG -Bestimmung die gleichen wie bei der Aufnahme der Eichkurve waren. Daher war zunächst die Magnesiumkonzentration zu bestimmen, da deren mögliche Änderung während der Gleichgewichtsdialyse einen großen Einfluß auf die Bestimmung des 2.3-Diphosphoglycerats gehabt hätte.
Nachdem sich herausgestellt hatte, daß die Magnesiumkonzentration nach der Dialyse gleich geblieben war, konnte die kinetische Methode benutzt werden. Die Ergebnisse zeigen die Abb. 10 und 11. Aus ihnen geht hervor, daß sich die Konzentration des 2.3-DPG nach der Dialyse dahingehend verschoben hatte, daß die Hämoglobin enthaltende Lösung einen höheren 2.3-DPG-Gehalt aufwies. Es hatte also eine Bindung von 2.3-DPG an das Desoxyhämoglobin stattgefunden. Wie weiter zu sehen

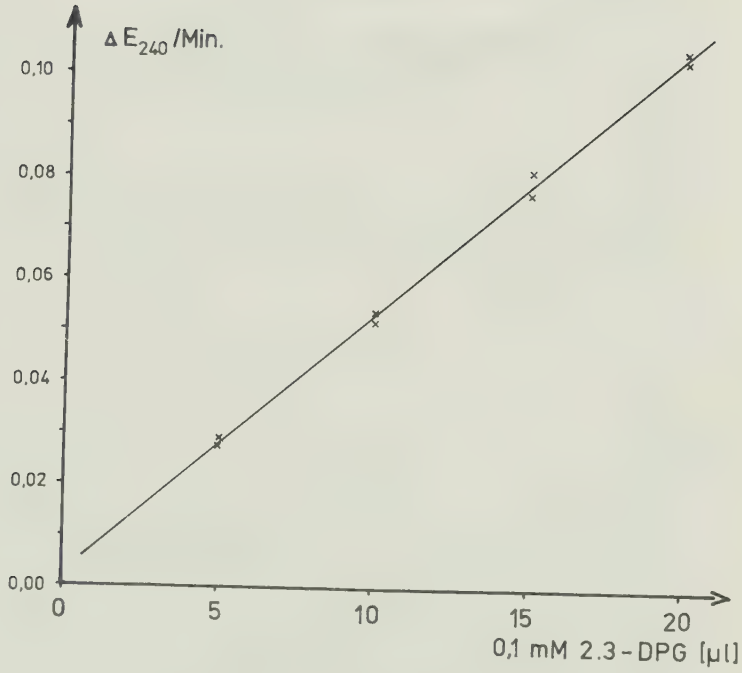
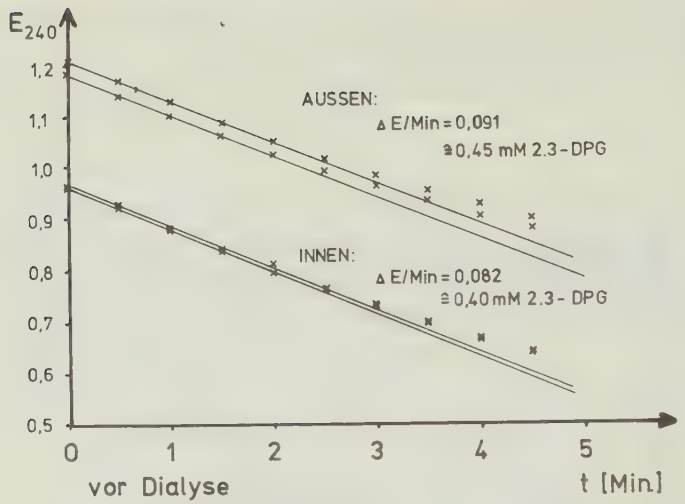


Abb. 10:
Eichkurve zur 2.3-Diphosphoglycerat-Bestimmung



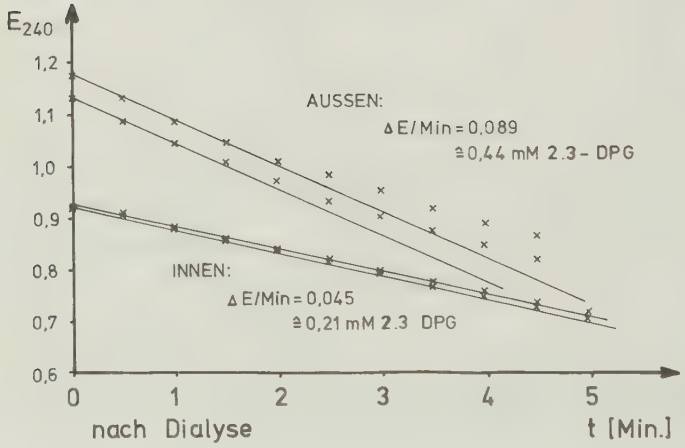


Abb. 11:
Änderung der 2.3-Diphosphoglycerat-Konzentration bei der Gleichgewichtsdialyse

ist, war jedoch die Gesamtkonzentration an 2.3-DPG geringer geworden. Eine Erklärung dafür ist, daß es sich bei der Hämoglobinlösung ja um ein Hämolysat handelte, bei dem eine Abtrennung der im Cytoplasma der Erythrozyten vorhandenen Glykolyseenzyme nicht vorgenommen worden war. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, daß ein Teil des 2.3-DPG im Laufe der Dialyse abgebaut wurde.

Die Konzentration des Magnesiums wurde nach zwei Methoden bestimmt. Erstens durch eine komplexometrische Titration mit photometrischer Endpunktbestimmung, zweitens durch Atomabsorptions-Spektrophotometrie.

Als Komplexbildner zur Magnesiumtitration wurde trans-1.2-Diaminocyclohexan-N.N.N´N´-tetraessigsäure ausgewählt, da es auch recht stabile Komplexe mit Magnesiumionen bildet. Ein Vergleich der Absorptionsmaxima verschiedener Metallindikatoren - nähere Angaben finden sich bei G. Schwarzenbach und H. Flaschka (31) - mit den im Photometer Eppendorf zur Verfügung stehenden Wellenlängen ließ die Verwendung von Metallphthalein als günstig erscheinen. Zu prüfen war, ob das 2.3-DPG als Komplexbildner in den verwendeten Konzentrationen einen Einfluß auf die Ergebnisse der Titration hatte. Dazu wurde eine bestimmte Menge Magnesium einmal ohne und einmal in Gegenwart der gleichen Menge 2.3-DPG titriert, wobei sich kein Unterschied im Verbrauch an Titrationsmittel feststellen ließ. Der Titrationsansatz befand sich in einer Küvette im Photometer und die Lösung von trans-1.2-Diaminocyclohexan-N.N.N´N´-tetraessigsäure wurde aus einem Mikrodosimeter der Fa. Ingold über einen Kapillarschlauch zugegeben, der in die Küvette eintauchte. Abb. 12 zeigt einige typische Titrationskurven; man erkennt, daß sich die Magnesiumkonzentration während der Gleichgewichtsdialyse nicht geändert hatte.

Das gleiche Ergebnis brachte auch die Magnesiumbestimmung im Atomabsorptions-Spektrophotometer. Zur Erzeugung der Spektrallinie des Magnesiums fand eine Hohlkathodenlampe für Calcium und

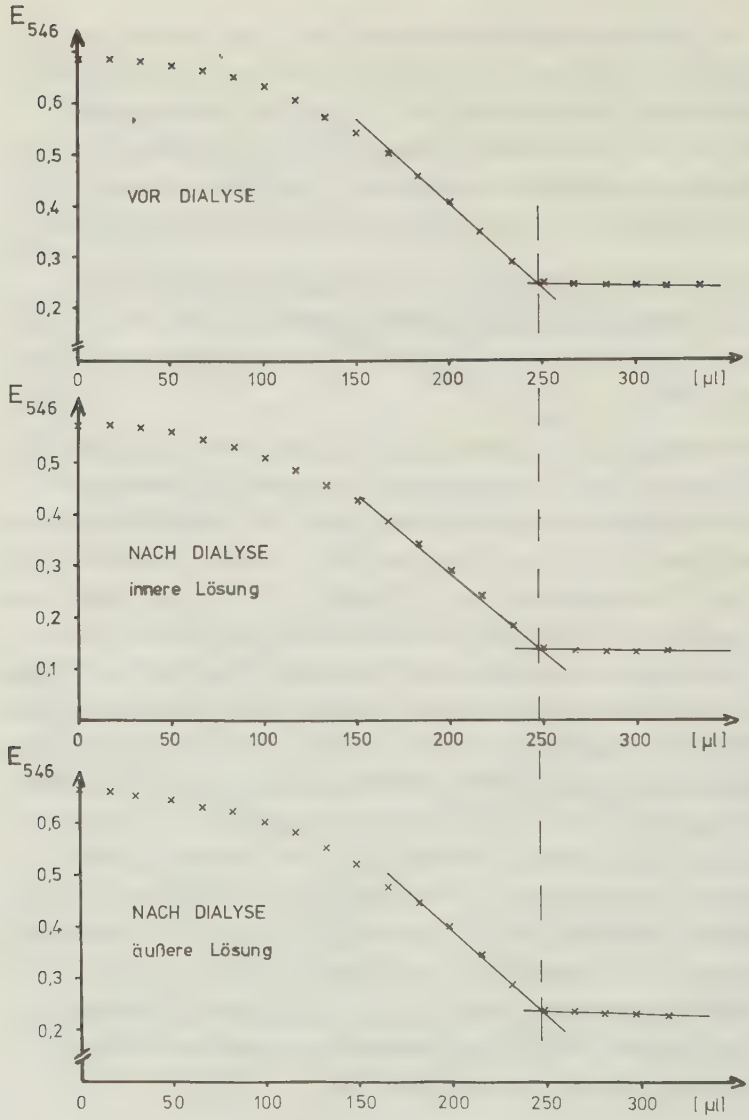


Abb. 12:

Komplexometrische Magnesiumtitration mit photometrischer Endpunktsanzeige

Magnesium Verwendung und die Atomisierung der Probe fand in einer Acetylen/Luft-Flamme statt. In Abb. 13 ist die zunächst aufgenommene Eichkurve angegeben und es sind die abgelesenen Extinktionen und zugehörigen Magnesiumkonzentrationen eingezeichnet. Diese Werte stammen aus einem anderen Ansatz, als die der Abb. 12. Sie liegen niedriger, weil bei diesem Ansatz die Magnesiumlösung nicht aus einer Fixanallösung bereitet, sondern durch Einwiegen des relativ hygroskopischen Magnesiumchlorids hergestellt wurde.

Zusammenfassend ergibt damit die Gleichgewichtsdialyse eine Veränderung der 2.3-DPG-Konzentration bei gleichbleibender Magnesiumkonzentration, was in Einklang mit der Annahme steht, daß zwar das 2.3-DPG-Anion, nicht aber sein Magnesiumkomplex an das Hämoglobin gebunden wird.

3.5.2. Sauerstoffbindungskurven

Das Spektrum des Oxyhämoglobins weist im Bereich von 500 nm bis 600 nm zwei gut ausgeprägte Absorptionsmaxima bei 540 nm und 576 nm auf, während das Desoxyhämoglobin in diesem Bereich nur eine Bande bei 560 nm besitzt. In Abb. 14 sind diese Spektren zusammen mit solchen von Hämoglobin verschiedenen Oxygenierungsgrades wiedergegeben, die mit dem registrierenden Spektralphotometer Modell Acta V der Fa. Beckman aufgenommen wurden. Zur Berechnung des Prozentsatzes an oxygeniertem Hämoglobin wurde die folgende Formel benutzt, die aus einer Veröffentlichung von Benesch und Mitarbeitern stammt (38).

$$\%\text{Oxy-Hb} = \frac{(E - E_{\text{Desoxy}})_{576} - (E_{\text{Desoxy}} - E)_{560}}{(E_{\text{Oxy}} - E_{\text{Desoxy}})_{576} - (E_{\text{Desoxy}} - E_{\text{Oxy}})_{560}} \cdot 100$$

Durch die Betrachtung der Extinktionsänderung bei 576 nm und 560 nm, also bei zwei Wellenlängen, bei denen sich die Änderung im Oxyge-

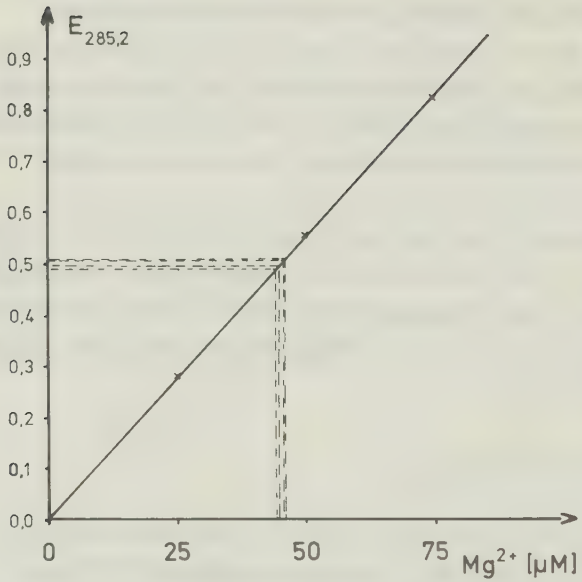


Abb. 13:
Magnesiumbestimmung im Atomabsorptions-Spektrophotometer, Eichkurve mit eingezeichneten Messwerten aus der Gleichgewichtsdialyse.

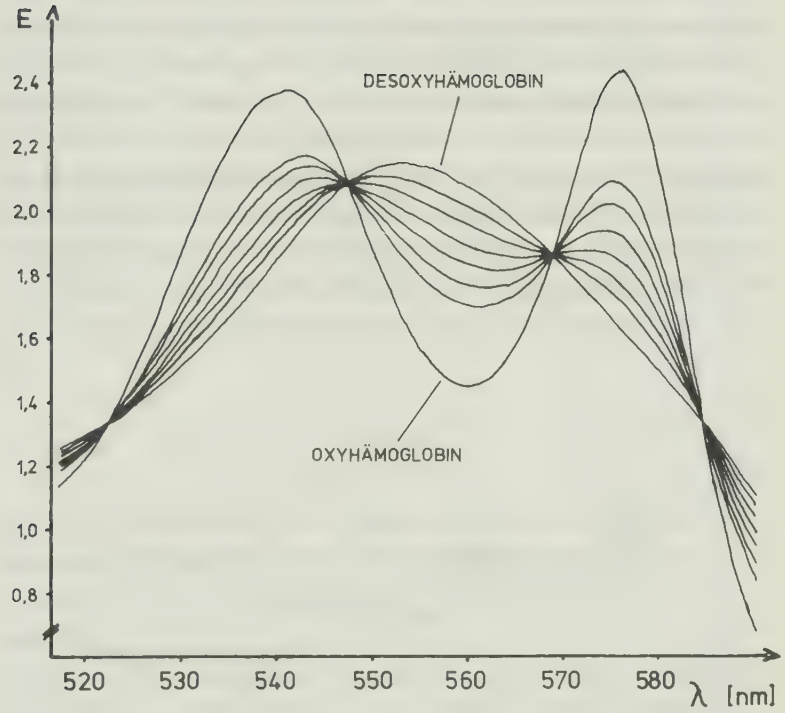


Abb. 14:

Absorptionsspektren von Hämoglobin

nierungsgrad entgegengesetzt auswirkt, wurden eventuelle Fehlermöglichkeiten bei der Aufnahme der Spektren ausgeglichen. Die Durchführung der Versuche folgte den Angaben von Rossi-Fanelli und Antonini (39). Nach deren Beschreibung wurden auch Tonometergefäße angefertigt (Abb. 15), die so groß waren, daß sie ohne Schwierigkeiten in den Probenraum des benutzten Spektralphotometers paßten. Eine spezielle Halterung ermöglichte das Einspannen in einen Rührmotor, so daß die Gefäße fast waagerecht in einem auf 25°C temperierten Wasserbad gedreht werden konnten. (Erste Versuche mit einer Schüttelmaschine führten zum baldigen Ausflocken des Proteins). Die Konzentration des Hämoglobins wurde so gewählt, daß die Maxima eine Extinktion von etwa 2,5 bei einer Schichtdicke von 1 cm hatten; ein Wert, der mit dem Acta V noch sehr gut gemessen werden konnte.

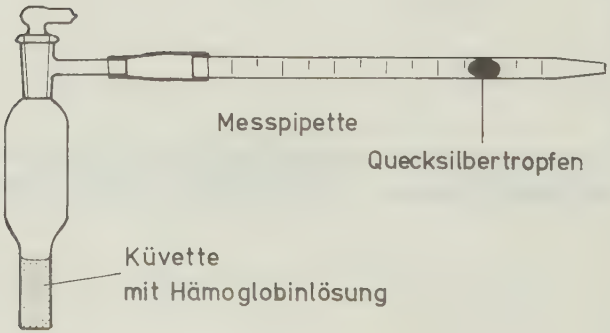


Abb. 15:
Tonometergefäß mit Pipette zur dosierten Luftzugabe

Zur Desoxygenierung wurde ein Vakuum von etwa 1 Torr angelegt, wobei die Lösung im Tonometer auf 0° C gekühlt wurde. Die Vollständigkeit der Sauerstoffabgabe und Einstellung des Gleichgewichts zum Gasraum wurde an Hand der Spektren verfolgt. Jeweils fünf bis sechs Messwerte wurden mit einer Hämoglobinlösung bestimmt, dann wurde neue Lösung benutzt. Die ermittelten Extinktionswerte in Abhängigkeit vom zugegebenen Luftvolumen, sowie die daraus berechneten Sauerstoffpartialdrucke und prozentualen Oxygenierungsgrade geben die Tabellen 7 - 11 wieder. Die Sauerstoffpartialdrucke im Tonometer (p_T) errechneten sich aus dem Verhältnis der Volumina des Tonometers - abzüglich des Lösungsvolumens - (V_T) zum zugegebenen Volumen Luft (V_0) und dem Partialdruck des Sauerstoffs der Luft (p_L), wobei bei den relativ geringen Hämoglobinkonzentrationen die Menge des an das Hämoglobin gebundenen Sauerstoffs unberücksichtigt bleiben konnte.

$$p_T = \frac{p_L \cdot V_0}{V_T}$$

Es wurden neben der des reinen Hämoglobins Sauerstoffbindungskurven aufgenommen, bei denen die Hämoglobinlösung 0,4 mM an 2.3-DPG war, sowie zusätzlich 1 mM, 10 mM und 20 mM an Magnesiumchlorid.
Die in Abb. 16 wiedergegebenen Sauerstoffbindungskurven bestätigen die Vermutung, daß Magnesium den Effekt des 2.3-DPG auf die Sauerstoffbindung des Hämoglobins teilweise rückgängig machen kann und sind ein weiterer Beweis dafür, daß es das freie 2.3-DPG-Anion ist, von dem der regulatorische Einfluß auf die Bindung des Sauerstoffs an das Hämoglobin ausgeht. Diese Schlußfolgerung läßt sich auch aus Versuchsergebnissen ziehen, über die Bunn und Mitarbeiter 1971 berichteten (31).

ml Luft	p_{O_2}	log p_{O_2}	E_{576}	E_{560}	% Oxy-Hb
0,00			1,63	2,o8	
0,05	0,57	-0,244	1,71	2,o2	9,72
0,10	1,1 4	0,146	1,78	1,96	18,75
0,15	1,17	0,233	1,86	1,90	28,47
0,2o	2,28	0,358	1,92	1,84	35,80
0,25	2,85	0,455	2,02	1,77	48,61
0,30	3,42	0,534	2,10	1,71	58,33
voll			2,45	1,46	
0,00			1,62	2,o5	
0,35	3,99	o,601	2,16	1,65	67,62
0,40	4,56	0,659	2,19	1,62	71,94
0,50	5,69	0,775	2,27	1,55	82,73
0,60	6,83	0,834	2,31	1,52	87,76
0,80	9,1 1	0,960	2,35	1,48	93,53
1,00	11,39	1,057	2,38	1,47	96,40
voll			2,40	1,44	

Tabelle 7:
Volumina Luft, die in das Tonometer gegeben wurden, Extinktionswerte aus den Hämoglobinspektren und daraus berechnete Werte für die Sauerstoffbindungskurven.
Reine Hämoglobinlösung.

ml Luft	p_{O_2}	log p_{O_2}	E_{576}	E_{560}	% Oxy-Hb
0,00			1,71	2,27	
0,20	2,28	0,358	1,76	2,23	5,29
0,25	2,85	o,455	1,79	2,21	8,23
0,36	4,10	0,613	1,86	2,16	15,29
0,40	4,56	0,659	1,88	2,14	17,64
0,45	5,12	0,709	1,92	2,10	22,35
0,50	5,69	0,755	1,97	2,06	27,64
voll			2,68	1,54	
0,00			1,68	2,24	
0,55	6,26	0,797	2,o4	2,04	29,78
0,60	6,83	0,834	2,08	2,03	34,04
0,65	7,40	0,869	2,13	1,96	38,82
0,70	7,97	0,907	2,19	1,92	44,14
0,75	8,54	0,932	2,25	1,89	48,93
0,80	9,11	0,960	2,28	1,86	52,12
voll			2,85	1,53	
0,00			1,68	2,21	
0,80	9,11	0,960	2,21	1,84	55,55
0,90	10,25	1,011	2,28	1,78	63,58
1,00	11,39	1,057	2,35	1,73	70,98
1,10	12,53	1,098	2,38	1,69	75,30
1,20	13,67	1,136	2,42	1,66	79,62
1,3o	14,80	1,170	2,46	1,64	83,33
voll			2,61	1,52	
0,00			1,65	2,17	
1,00	11,39	1,057	2,34	1,63	77,84
1,20	13,67	1,136	2,42	1,58	86,07
1,40	15,94	1,203	2,46	1,54	91,13
1,60	18,22	1,261	2,47	1,52	93,03
1,80	20,50	1,302	2,49	1,50	95,56
2,00	22,78	1,358	2,49	1,49	96,20

Tabelle 8:
Volumina Luft, die in das Tonometer gegeben wurden, Extinktionswerte aus den Hämoglobinspektren und daraus berechnete Werte für die Sauerstoffbindungskurven. Hämoglobinlösung, die 0,4 mM an 2.3-DPG ist.

ml Luft	p_{O_2}	log p_{O_2}	E_{576}	E_{560}	% Oxy-Hb
0,00			1,65	2,15	
0,05	0,57	-0,244	1,67	2,12	3,18
0,10	1,14	0,146	1,68	2,11	4,45
0,15	1,71	0,233	1,71	2,10	7,00
0,20	2,28	0,358	1,73	2,07	10,19
0,25	2,85	0,455	1,76	2,06	12,73
0,30	3,42	0,534	1,79	2,03	16,56
voll			2,55	1,48	
0,00			1,64	2,14	
0,30	3,42	0,534	1,83	1,98	23,33
0,35	3,99	0,601	1,88	1,95	28,66
0,40	4,56	0,659	1,91	1,91	33,33
0,45	5,12	0,709	1,95	1,87	38,66
0,50	5,69	0,755	2,00	1,84	44,00
0,55	6,26	0,797	2,03	1,80	48,66
voll			2,48	1,48	
0,00			1,61	2,09	
0,55	6,26	0,797	1,98	1,82	44,13
0,60	6,83	0,834	2,02	1,79	48,96
0,65	7,40	0,869	2,06	1,76	53,79
0,70	7,97	0,902	2,08	1,72	57,93
0,77	8,77	0,943	2,13	1,70	62,75
0,85	9,68	0,986	2,18	1,65	69,65
voll			2,42	1,45	
0,00			1,61	2,12	
0,85	9,68	0,986	2,26	1,65	69,56
0,90	10,25	1,011	2,28	1,62	72,67
1,00	11,39	1,057	2,36	1,60	78,88
1,10	12,53	1,098	2,41	1,58	83,22
1,20	13,67	1,136	2,43	1,56	84,47
1,30	14,80	1,170	2,46	1,54	88,81
voll			2,56	1,46	

Tabelle 9:
Volumina Luft, die in das Tonometer gegeben wurden, Extinktionswerte aus den Hämoglobinspektren und daraus berechnete Werte für die Sauerstoffbindungskurven. Hämoglobinlösung, die 0,4 mM an 2.3-DPG und lmM an Magnesium ist.

ml Luft	p_{O_2}	log p_{O_2}	E_{576}	E_{560}	% Oxy-Hb
0,00			1,60	2,08	
0,05	0,57	-0,244	1,64	2,05	4,76
0,10	1,14	0,146	1,69	2,03	9,52
0,15	1,71	0,233	1,72	2,00	13,60
0,20	2,28	0,358	1,76	1,96	19,04
0,25	2,85	0,455	1,79	1,93	23,80
voll			2,45	1,46	
0,00			1,59	2,06	
0,20	2,28	0,358	1,78	1,92	22,75
0,25	2,85	0,455	1,81	1,88	27,58
0,30	3,42	0,534	1,86	1,84	33,79
0,35	3,99	0,601	1,91	1,80	40,00
0,40	4,56	0,659	1,96	1,75	46,89
0,45	5,12	0,709	2,00	1,71	52,41
voll			2,40	1,42	
0,00			1,69	2,15	
0,50	5,69	0,755	2,19	1,77	61,11
0,55	6,26	0,797	2,23	1,73	66,66
0,60	6,83	0,834	2,26	1,69	71,52
0,70	7,97	0,902	2,31	1,64	78,47
0,80	9,11	0,960	2,34	1,60	83,33
1,00	11,39	1,057	2,39	1,56	89,58
voll			2,48	1,50	

Tabelle 10:
Volumina Luft, die in das Tonometer gegeben wurden, Extinktionswerte aus den Hämoglobinspektren und daraus berechnete Werte für die Sauerstoffbindungskurven. Hämoglobinlösung, die 0,4 mM an 2.3-DPG und lo mM an Magnesium ist.

ml Luft	p_{O_2}	log p_{O_2}	E_{576}	E_{560}	% Oxy-Hb
0,00			1,63	2,09	
0,05	0,57	- 0,244	1,68	2,04	7,14
0,10	1,14	0,146	1,71	2,01	11,42
0,15	1,71	0,233	1,74	1,98	15,71
0,21	2,39	0,378	1,79	1,93	22,85
0,25	2,85	0,455	1,82	1,90	27,14
0,30	3,42	0,534	1,86	1,86	32,85
voll			2,40	1,46	
0,00			1,58	2,o5	
0,30	3,42	0,534	1,88	1,84	35,91
0,35	3,99	0,601	1,93	1,79	42,95
0,40	4,56	0,659	1,98	1,74	50,00
0,45	5,12	0,709	2,04	1,69	57,74
0,50	5,69	0,755	2,08	1,65	63,38
0,55	6,26	0,797	2,11	1,62	67,60
voll			2,37	1,42	
0,00			1,62	2,07	
0,60	6,83	0,834	2,21	1,63	72,02
0,75	8,54	0,932	2,30	1,56	83,21
0,80	9,11	0,960	2,32	1,54	86,01
0,90	10,25	1,0 11	2,34	1,52	88,81
1,00	11,39	1,057	2,35	1,50	90,90
1,20	13,67	1,079	2,36	1,48	93,00
voll			2,42	1,44	

Tabelle 11:
Volumina Luft, die in das Tonometer gegeben wurden, Extinktionswerte aus den Hämoglobinspektren und daraus berechnete Werte für die Sauerstoffbindungskurven. Hämoglobinlösung, die 0,4 mM an 2.3-DPG und 20 mM an Magnesium ist.

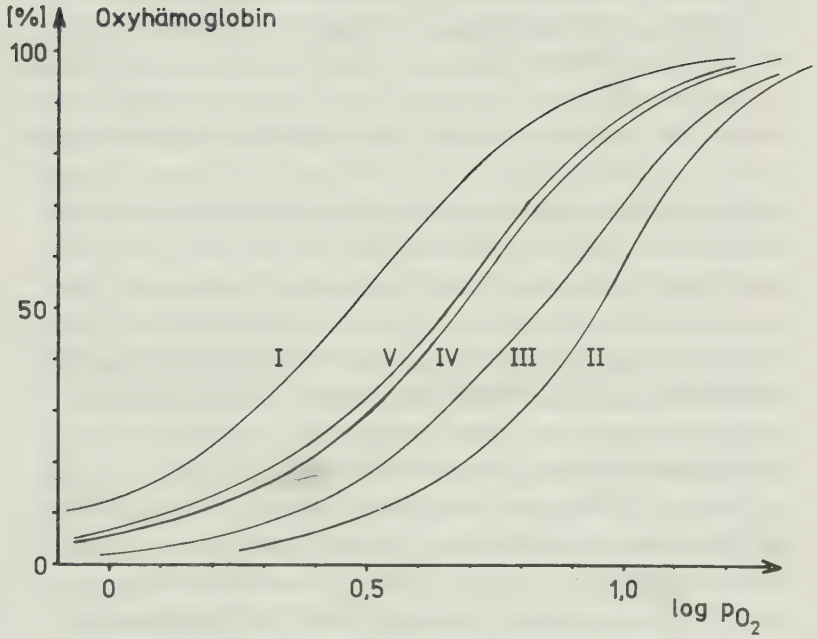


Abb. 16:
Sauerstoffbindungskurven,
I : Über Sephadex G 25 gereinigtes Hämoglobin,
II : in 0,4 mM 2.3-DPG,
III: + 1 mM Mg^{2+},
IV: + 10 mM Mg^{2+},
V : + 20 mM Mg^{2+}

3.5.3. Beobachtung der Magnesiumkonzentration bei der Lagerung von Blutkonserven

Es ist bekannt (48), daß bei der Lagerung von Blutkonserven eine rasche Abnahme der 2.3-DPG-Konzentration in den Erythrozyten eintritt. Offensichtlich wird nicht nur das ATP, sondern noch eher das 2.3-DPG zur Energiegewinnung verstoffwechselt. Das hat zur Folge, daß die Sauerstoffbindungskurve zu niedrigeren Partialdrucken verschoben wird (vgl. Abb. 16) und hat zu der Befürchtung Anlaß gegeben, daß nach der Transfusion älterer Blutkonserven die Abgabe des Sauerstoffs an das Gewebe nicht mehr gewährleistet sei. Aus den vorangegangenen Abschnitten wird der starke Einfluß der Magnesiumkonzentration deutlich, der bei der Diskussion über die Fähigkeit der Erythrozyten zur Bindung und Abgabe des Sauerstoffs nicht mehr außer acht gelassen werden darf. In den Erythrozyten ist sicher die Hauptmenge des Magnesiums komplex an das ATP und 2.3-DPG gebunden. Verschwinden nun diese beiden Verbindungen, müssen erhebliche Mengen des Magnesiums in den freien ionisierten Zustand übergehen. Es war daher zu fragen, ob die Zelle in dieser Lage, in der ihr weniger Energie zur Verfügung steht, den Magnesiumgradienten gegenüber dem Serum aufrechterhalten kann, oder ob während der Lagerung einer Blutkonserve eine Abnahme des Magnesiums in den Erythrozyten eintritt. Wie auch aus Abb. 16 deutlich wird, wäre damit eine teilweise Kompensation der stärkeren Bindung des Sauerstoffs in Abwesenheit von 2.3-DPG zu erwarten gewesen.

Da sich in der Literatur keine Angaben über Magnesiumkonzentrationen bei der Lagerung von Blutkonserven fanden, wurde eine entsprechende Reihe von Magnesiumbestimmungen vorgenommen. Dazu wurden Proben von jeweils 4 ml Blut in 1 ml steriler "saurer Citrat/Glucose-Lösung" (Standard ACD) unter sterilen Bedingungen aufgefangen und im Kühlschrank bei $3^{o}C$ gelagert. (Die ACD-Lösung enthält in 1000 ml 13,2 g Natriumcitrat-Dihydrat, 4,4 g Citronensäure und 14,7 g Glucose-Monohydrat). Zu den angegebenen Zeitpunkten, durch-

schnittlich nach jeweils einer Woche, wurden von einer Probe die Erythrozyten abzentrifugiert, mit eiskalter physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und mit bidest. Wasser hämolysiert. In einer Verdünnung des Serums von 1 : 25 und der gepackten Erythrozyten von 1 : 50 wurde die Magnesiumkonzentration mit dem Atomabsorptions-Spektrophotometer gemessen (vgl. Abschnitt 3. 5. 1.). Nach Korrektur der Werte auf unverdünntes Serum bzw. Cytoplasma der Erythrozyten (nach 65) ergab sich der in Abb. 17 dargestellte Verlauf.

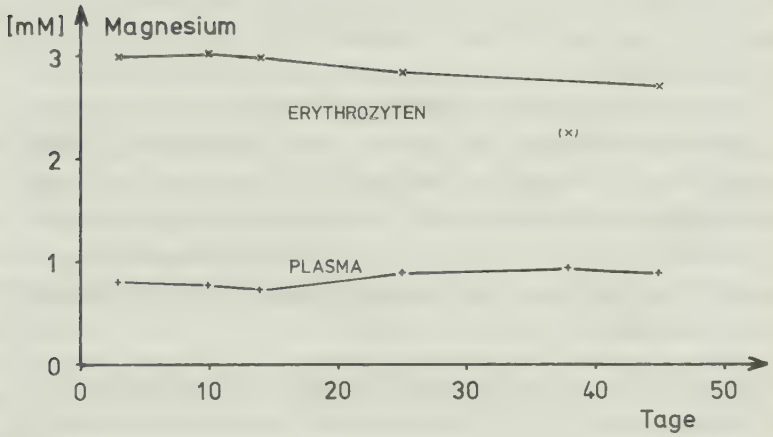


Abb. 17:
Magnesiumkonzentrationen in Erythrozyten und Plasma von Blutkonserven

Es hatte also nur eine geringfügige Abnahme der Magnesiumkonzentration stattgefunden und damit hatte sich die Möglichkeit nicht bestätigt, daß die durch das Verschwinden des 2.3-DPG eintretende Verschiebung der Sauerstoffbindungskurve durch einen Verlust an Magnesium teilweise aufgehoben würde.

3.6. Einfluß von 2.3-DPG und Magnesiumionen auf die Aktivität der Hexokinase

Der besondere Stoffwechsel der Erythrozyten mit ihrer hohen Konzentration an 2.3-DPG, sowie dessen starker Einfluß auf die Sauerstofftransportfunktion als spezielle Eigenschaft dieser Zellen, machen sicher einen eigenen Mechanismus zur Einhaltung bzw. gegebenenfalls gezielten Änderung dieser Konzentration erforderlich. Im Ablauf des Erythrozytenstoffwechsels nimmt die Hexokinase eine Schlüsselstellung ein. Da sie, wie erwähnt, in intakten Erythrozyten nicht ihre volle Aktivität besitzt, scheint hier dieser Regelmechanismus anzugreifen, das heißt in einer Beschleunigung oder Verlangsamung der gesamten Glykolyse zu bestehen. Dies ist für die Zelle wohl auch der zweckmäßigste Weg. Der Angriff der Regulation bei einer anderen Reaktion der Glykolyse - hier böte sich z.B. eine Aktivierung der Diphosphoglycerat-Mutase bzw. Hemmung der 2.3-Diphosphoglycerat-Phosphatase an - hätte zur Folge, daß insgesamt weniger ATP pro Zeiteinheit gebildet würde.

Die bisher beschriebenen Untersuchungen über die Hemmung der Erythrozytenhexokinase (12, 42) wurden nur mit Hämolysaten durchgeführt. Dieses Verfahren hat aber neben dem Vorteil der einfachen Herstellung einer aktiven Proteinlösung zwei entscheidende Nachteile, die es als wünschenswert erscheinen ließen, neue Untersuchungen in dieser Richtung anzustellen. Erstens ist die optische Dichte dieser Lösungen infolge der hohen Hämoglobinkonzentrationen so groß, daß auch in sehr leistungsfähigen Photometern nur mit sehr geringen Enzymaktivitäten gearbeitet werden kann (vgl. S. 11), zweitens enthalten solche Hämolysate auch die Enzyme, die zur Bildung und zum Abbau des

2.3-DPG dienen, was dazu führen muß, daß sich die Konzentration des 2.3-DPG während der Messung verändert. So können z.B. Reaktionsfolgen ablaufen, wie sie in Abschnitt 3.5.1. beschrieben wurden, wo sie zur Bestimmung von 2.3-DPG dienten, die aber auch zur Veränderung der NADH-Konzentration führen, die hier als Messgröße benutzt werden soll. Eine weitere Ungenauigkeit der angeführten Untersuchungen, die darin bestand, daß die Komplexbildung des 2.3-DPG mit dem Magnesium nicht berücksichtigt wurde, konnte mit Hilfe der nun bekannten Komplexbildungskonstanten beseitigt werden. Da das 2.3.-DPG ein relativ schwacher Komplexbildner für das Magnesium ist, konnte es in dem zu betrachtenden Konzentrationsbereich vorteilhaft als Puffersubstanz für einen Magnesiumpuffer von 10^{-2}, 10^{-3} und 10^{-4} M freier (hydratisierter) Magnesiumionenkonzentration verwendet werden. Damit war es möglich, diesen Parameter eindeutig festzulegen und die Reaktion bei einer konstanten Magnesiumionenkonzentration durchzuführen.

Hexokinase ist aus vielen Geweben hergestellt worden, wie Skelettmuskel, Gehirn, Herzmuskel, Niere, Leber, Fettgewebe und Dünndarm (43, 44, 45, 46), es fand sich in der Literatur aber kein Hinweis für eine Reindarstellung des Enzyms aus Erythrozyten. Das mag mit daran gelegen haben, daß dazu eine Abtrennung des in solchem Übermaß vorhandenen Hämoglobins notwendig war. Für das weitere Vorgehen erwies sich die Methode von Hennessey und Mitarbeitern (47) als sehr nützlich, die eine Reihe von Glykolyseenzymen durch Bindung an DEAE-Cellulose in einem "batch"-Verfahren vom Hämoglobin befreien konnten.

Zunächst wurden die vorgesehenen Versuche an Hefehexokinase durchgeführt, die von Boehringer bezogen wurde. Die Aufgabe bestand dann weiter darin, Hexokinase aus Erythrozyten zu gewinnen und ihre Hemmbarkeit durch 2.3-DPG zu untersuchen sowie den Einfluß des Magnesiums zu bestimmen.

3.6.1. Hefehexokinase

Zur Aktivitätsbestimmung diente ein optischer Test, dem folgender Reaktionsablauf zugrunde lag:

$$\text{Glucose} + \text{ATP} \xrightleftharpoons{\text{Hexokinase, } Mg^{2+}} \text{Glucose-6-phosphat} + \text{ADP}$$

$$\text{Glucose-6-phosphat} + \text{NADP} \xrightleftharpoons{\text{Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase}} \text{Gluconsäurelacton-6-phosphat} + \text{NADPH} + H^+$$

Hierbei trat ein rascher Akti vitätsverlust in der gebrauchsfertig verdünnten Enzymlösung auf. Durch Zugabe von Mercaptoäthanol konnte die Stabilität verbessert werden, es war aber notwendig, bei allen weiteren Messungen jeweils einen Bezugswert gleichzeitig zum Bestimmungsansatz laufen zu lassen, wie dies Abb. 18 zeigt. (Der Vergleichsansatz wurde 15 Sekunden früher gestartet). Die Reaktionsgeschwindigkeit des Bezugsansatzes wurde gleich 100 % gesetzt und die Enzymaktivität als Prozentsatz der ungehemmten Reaktion angegeben. Um entscheiden zu können, welcher Einfluß durch die verschiedenen Magnesiumkonzentrationen unabhängig vom 2.3-DPG hervorgerufen wurde, waren die gleichen Versuche mit einem anderen Magnesiumpuffer durchzuführen. Als Komplexbildner wurde hierfür Citronensäure gewählt, da sie eine Komplexbildungskonstante für Magnesium von logK = 3,2 besitzt und damit etwa den gleichen Wert wie für 2.3-DPG hat. Es war auch nicht zu erwarten, daß das Citrat einen nennenswerten Einfluß auf die Hexokinase hatte.

Für den 2.3-DPG-Magnesium-Puffer waren aber ein protonierter und ein nicht protonierter Komplex zu berücksichtigen, so daß sich die gesamte Magnesiumkonzentration zusammensetzt aus den Konzentrationen der beiden Komplexe und der des ionisierten Magnesiums.

$$[Mg]_t = [Mg^{2+}] + [Mg2.3\text{-DPG}] + [MgH2.3\text{-DPG}]$$

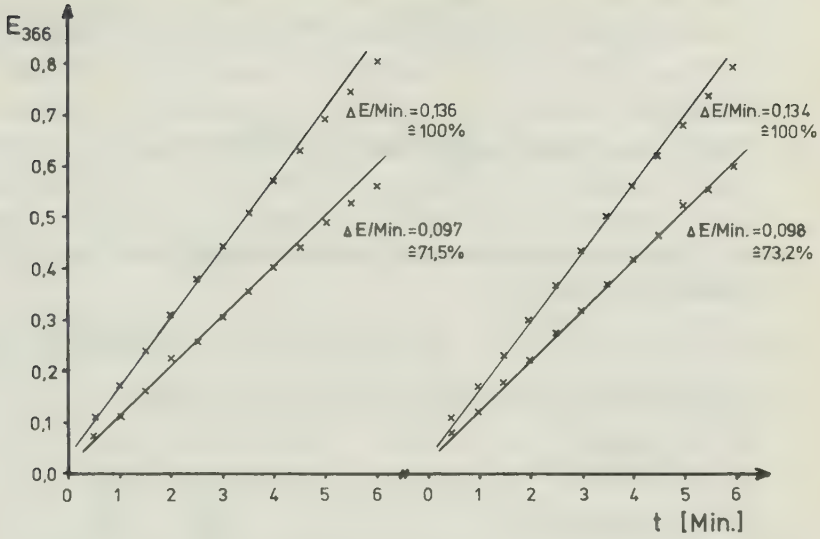


Abb. 18:
Doppelbestimmung von Hefehexokinase im optischen Test
(mit Vergleichswerten)

Da die Konzentration des Citrats bzw. des 2.3-DPG mit 20 mM genügend größer als die des ATP mit ca. 0,5 mM gewählt war, konnte davon ausgegangen werden, daß die Pufferkapazität ausreichte, um die Bindung von Magnesiumionen durch das ATP zu kompensieren. Daher wurde die Komplexbildung durch das ATP bei der Berechnung unberücksichtigt gelassen. Bezeichnet man mit K_I und K_{II} die Dissoziationskonstanten der Komplexe und setzt $[Mg^{2+}] = b$, so ist

$$K_I = \frac{b \cdot [\,2.3\text{-DPG}]}{[\text{Mg}2.3\text{-DPG}]} \quad , \quad K_{II} = \frac{b \cdot [\,\text{H}2.3\text{-DPG}]}{[\text{MgH}2.3\text{-DPG}]}$$

und man kann in der vorstehenden Gleichung ersetzen

$$[Mg2.3\text{-}DPG] = \frac{b\cdot[2.3\text{-}DPG]}{K_I} \text{ und } [MgH2.3\text{-}DPG] = \frac{b[H2.3\text{-}DPG]}{K_{II}}$$

so daß folgt

$$[Mg]_t = b \cdot \left(1 + \left(\frac{[2.3\text{-}DPG]}{K_I} + \frac{[H2.3\text{-}DPG]}{K_{II}}\right)\right)$$

Das 2.3-DPG kommt in der Lösung des Magnesiumpuffers in vier verschiedenen Formen vor:

$$[2.3\text{-}DPG]_t = [2.3\text{-}DPG] + [H2.3\text{-}DPG] + [Mg2.3\text{-}DPG] + [MgH2.3\text{-}DPG]$$

Aus der Titrationskurve (Abb. 5) ergibt sich das Verhältnis

$$\frac{[2.3\text{-}DPG]}{[H2.3\text{-}DPG]} = a$$

und damit resultiert für die Gesamt-2.3-DPG-Konzentration

$$[2.3\text{-}DPG]_t = [2.3\text{-}DPG] + \frac{[2.3\text{-}DPG]}{a} + \frac{b[2.3\text{-}DPG]}{K_I} + \frac{b[2.3\text{-}DPG]}{aK_{II}}$$

$$= [2.3\text{-}DPG] \cdot \left(1 + \frac{1}{a} + \frac{b}{K_I} + \frac{b}{aK_{II}}\right)$$

a wurde für pH 7,6 zu 1,045 bestimmt. Durch Kombination mit der Gleichung für $[Mg]_t$ erhält man die Möglichkeit, die Gesamt-Magnesiumkonzentration für eine vorgegebene Konzentration an 2.3-DPG bei dem gewünschten pMg-Wert zu berechnen.

$$[Mg]_t = b \cdot \left[1 + \frac{2.3\text{-}DPG}{1 - \frac{1}{a} - bK_I - \frac{bK_{II}}{a}} \cdot \left(K_I - \frac{K_{II}}{a}\right)\right]$$

Die Ergebnisse der Untersuchungen der Hefehexokinase sind in der Abb. 19 zusammengefaßt. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte aus meist sechs Bestimmungen, so daß auch Fehler angegeben werden konnten. Die in citratgepufferten Lösungen erhaltenen Werte zeigen das erwartete Bild, nämlich eine mit sinkender Magnesiumkonzentration stärkere Abhängigkeit der Hexokinase-Reaktion vom pMg. Zwischen pMg=2 und pMg=3 liegt praktisch das gesamte ATP als Magnesiumkomplex vor, hier ist die Abhängigkeit sehr gering. Offenbar übt auch das Citrat eine geringfügige Hemmwirkung auf die Hefehexokinase aus.

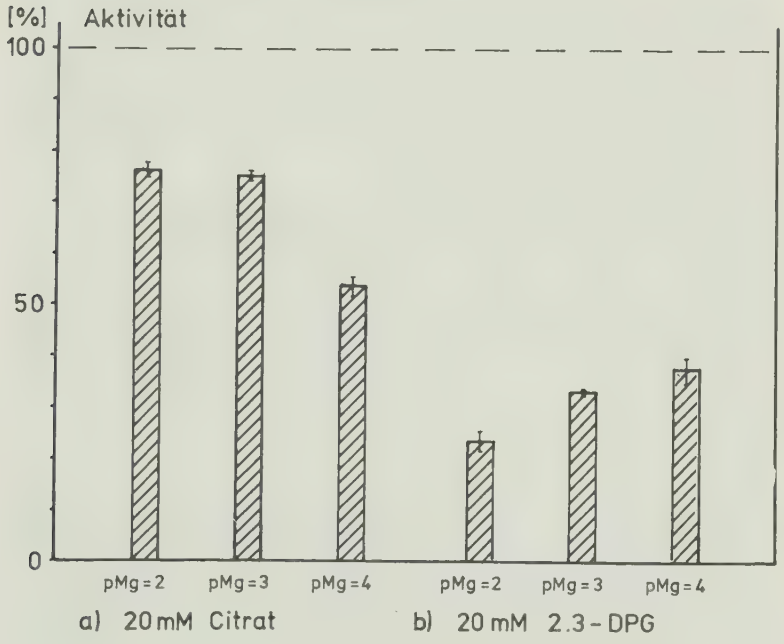


Abb. 19:
Abhängigkeit der Hemmwirkung von Citrat und 2.3-Diphosphoglycerat auf Hefehexokinase von der Magnesiumkonzentration

Bemerkenswert war dagegen das Verhalten gegenüber dem 2.3-DPG. Abgesehen von der nicht unerwarteten, beträchtlichen Hemmung des Enzyms deutet die geringere Aktivität bei größeren Magnesiumkonzentrationen darauf hin, daß der 2.3-DPG-Magnesiumkomplex eine stärkere Hemmwirkung auf die Hefehexokinase ausübt als das freie 2.3-DPG. Selbstverständlich ist es nicht möglich, diese Ergebnisse ohne weiteres auf H exokinase aus Erythrozyten zu übertragen.

3.6.2. Darstellung von Hexokinase aus Kaninchenerythrozyten

Die Wahl fiel auf Kaninchen als Blutspender aus mehreren Gründen: Sie gehören zu den größeren Labortieren, die sich noch sehr bequem halten und mit handelsüblichem Standardfutter versorgen lassen. Man kann ausgewachsenen Tieren ohne Schaden 30 bis 40 ml Blut entnehmen. Auch die Blutentnahme aus den Blutgefäßen des Ohres macht bei richtigem Vorgehen keine Schwierigkeiten.
Nach Bartlett (48) gehören Kaninchenerythrozyten mit 20 µMol 2.3-DPG/ml roter Blutzellen zu den Zellen, die die höchsten Konzentrationen an 2.3-DPG besitzen. Daraus war zu folgern, daß wegen der Hemmwirkung des 2.3-DPG die Kaninchene rythrozyten eine besonders hohe Hexokinaseaktivität besitzen, was sich bei einem Vergleich von Hämolysaten aus Kaninchen- und Humanblut im optischen Test bestätigte.

Die Bildung der Erythrozyten im Knochenmark verläuft über eine Reihe von Zwischenstufen - Proeythroblast, Erythroblast und Retikulozyt. Diese Zellen besitzen noch einen Zellkern und haben einen beträchtlichen Atmungs- und Synthesestoffwechsel. Beim reifen Erythrozyten haben sich jedoch Zellkern, Mitochondrien und Ribosomen aufgelöst und er bezieht seine Energie praktisch nur noch aus der Glykolyse. Er ist auch nicht mehr zur Neusynthese von Protein befähigt und hat deshalb mit zunehmenden Alter immer niedrigere Enzymaktivitäten.

Je mehr Retikulozyten und junge Erythrozyten daher das zu untersuchende Blut enthält, um so besser ist es geeignet, als Ausgangsmaterial zur Gewinnung von Enzymen zu dienen. Eine vermehrte Neubildung läßt sich z. B. durch Erzeugen einer Entblutungsanämie erreichen, wobei abzuwägen ist, ob die durch den höheren Gehalt des Blutes an Retikulozyten bedingte größere Enzymaktivität gegenüber der insgesamt sinkenden Zahl an roten Blutkörperchen einen Vorteil verspricht. Nach den Untersuchungen von Rapoport und Mitarbeitern (49, 50) steigt dabei die Retikulozytenzahl etwa auf den vierfachen Wert, während die Zahl der Blutkörperchen auf etwa ein Drittel sinkt. Sie berichten auch (51), daß die Enzymaktivität in den Retikulozyten mehr als zehnmal so hoch sei.
Auf diese Weise konnte also das ungünstige Verhältnis von Enzymprotein zu Hämoglobin zugunsten der Enzyme verschoben werden, was besonders wegen der Instabilität der Hexokinase in verdünnten Proteinlösungen bessere Erfolge versprach. Den Kaninchen wurden daher etwa eine Woche lang täglich wenigstens 30 ml Blut abgenommen und nach einer Pause von zwei Tagen ebenfalls ca. 30 ml, die dann zur Enzymgewinnung dienten. Der Verlauf der Anämie wurde durch Bestimmung der Erythrozyten- und Retikulozytenzahl sowie des Hämatokritwertes verfolgt. Ein Beispiel dafür gibt Abb. 20.

Nach dem Abzentrifugieren und Waschen der Erythrozyten wurden diese in einem Puffer hämolysiert, der EDTA und Mercaptoäthanol enthielt, da die Hexokinase SH-Gruppen besitzt und daher empfindlich gegenüber oxydierenden Einflüssen ist. (Erythrozyten enthalten relativ viel Glutathion, das in Verbindung mit der Glutathion-Reduktase als reduzierendes System dient). Der Puffer enthielt außerdem Glucose, was durch Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes stabilisierend auf die Hexokinase wirken sollte. Das Hämolysat wurde zunächst einer Gelfiltration an Sephadex G 25 unterzogen, um 2.3-DPG und andere Phosphorsäureester zu entfernen, die die Kapazität der DEAE-Cellulose unnötig belastet und zu einer Verbreiterung der Banden geführt

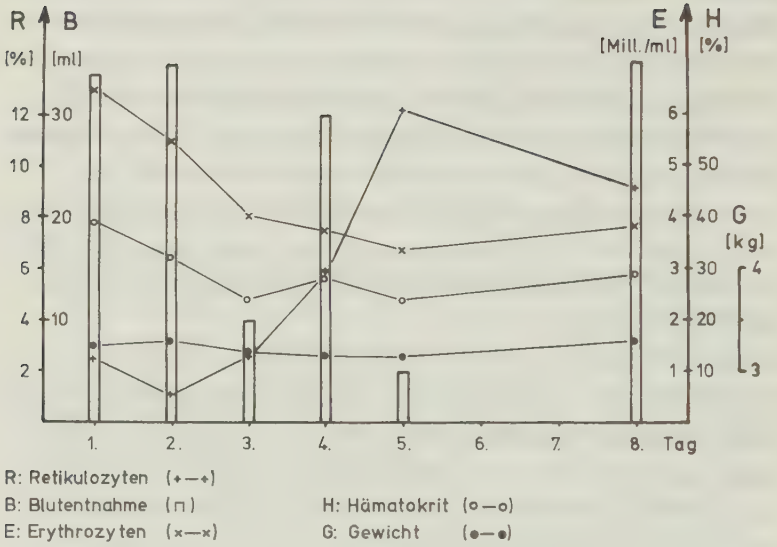


Abb. 20:

Verlauf einer Entblutungsanämie beim Kaninchen

hätten. Die folgende Ionenaustauschchromatographie diente hauptsächlich dazu, das Hämoglobin abzutrennen. Es besitzt einen Isoelektrischen Punkt, der wenig über pH 7 liegt, so daß es bei pH 7,0 insgesamt ungeladen erscheint und nicht an den Ionenaustauscher gebunden wird. Die an die DEAE-Cellulose gebundenen Proteine enthalten auch die Hexokinase; in der aus der Säule herausgewaschenen Hämoglobinlösung war eine Hexokinaseaktivität nicht mehr nachzuweisen. Mit Hilfe eines Kaliumchloridgradienten wurden die an den Ionenaustauscher gebundenen Proteine nacheinander wieder aus der DEAE-Cellulosesäule herausgewaschen und in einem Fraktionssammler aufgefangen. Die einzelnen Fraktionen wurden auf ihre Hexokinaseaktivität getestet und die Extinktion bei 280 nm gemessen. Ein solches Elutionsdiagramm zeigt Abb. 21.

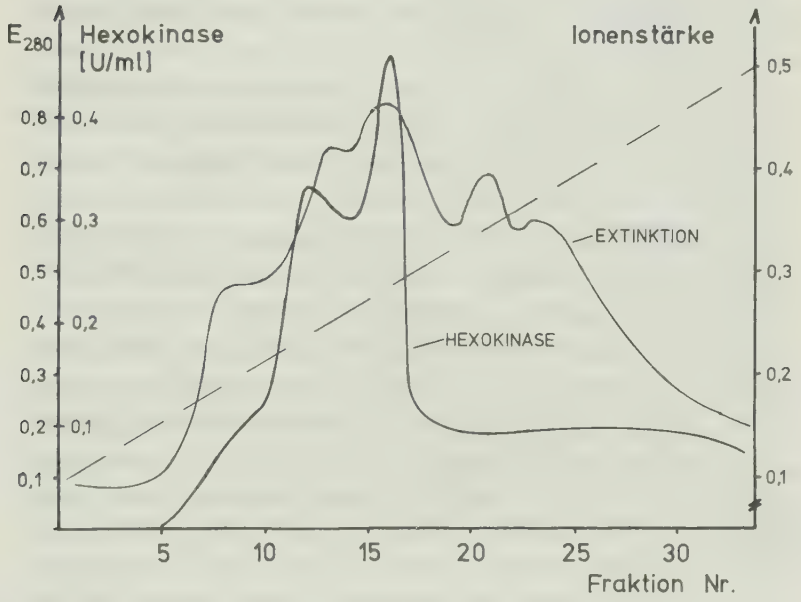


Abb. 21:
Hexokinaseaktivität im Eluat der DEAE-Cellulose-Säule

Die Hexokinasebande besteht offensichtlich aus zwei Enzymen, die sicher bei Verkleinerung der Fraktionen hätten getrennt werden können. Auch Grossbard und Schimke (44) beschreiben das Auftreten von zwei bis vier Isoenzymen der Hexokinase in verschiedenen Geweben. Da jedoch die gesamte Aktivität sehr gering war, mußten für die anschließenden Messungen alle aktiven Fraktionen zusammengenommen werden. So entsprechen die Ergebnisse auch besser dem Verhalten in intakten Erythrozyten. Nach Konzentrieren der Enzymlösung um das Fünffache mit Hilfe einer Ultrafiltrationszelle von Amicon enthielt die Lösung ca. 0,12 I.U./ml Hexokinase bezogen auf 2-Desoxyglucose als Substrat in insgesamt 15 ml Enzymlösung. Die 2-Desoxyglucose hat bei ungereinigten Enzymlösungen den Vorteil, daß das gebildete 2-Desoxyglucose-6-phosphat nicht in der Glykolyse verstoffwechselt wird. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist allerdings geringer als mit Glucose als Substrat. Nach Sephadex G 25 - Chromatographie enthielten 113 ml Hämolysat noch 0,22 I.U./ml, das heißt von 25 I.U. waren nur noch 1,8 I.U. übriggeblieben. Dieser Verlust an aktivem Enzym ist sicher nicht auf unsauberes Arbeiten zurückzuführen, sondern er zeigt sehr deutlich die große Empfindlichkeit der Hexokinase. So mußten die Versuche zur Hemmung des Enzyms immer auch direkt nach dem Austesten des Eluats der DEAE-Cellulosesäule durchgeführt werden, da bereits nach eintägigem Stehen im Kühlschrank die Aktivität so stark abgenommen hatte, daß die Hemmwirkung des 2.3-DPG nicht mehr untersucht werden konnte. Wie zu erwarten, besaßen hohe Konzentrationen fremden Proteins einen stabilisierenden Einfluß. So konnte auch das Hämolysat ohne großen Aktivitätsverlust einige Tage im Kühlschrank aufbewahrt bleiben. Vielleicht ist dies ein Grund dafür, daß über aus Erythrozyten isolierte Hexokinase bisher nicht berichtet wurde.

3.6.3. Erythrozytenhexokinase

Gerber und Schultze benutzten 1970 (52) zur Bestimmung von Erythrozytenhexokinase in Hämolysaten eine pH-Stat-Methode.
Bei der Reaktion von Glucose mit ATP entsteht durch die Spaltung der Säureanhydridbindung eine weitere saure Gruppe. Das Proton kann durch Neutralisation mit Natronlauge quantitativ erfaßt werden und man hat damit die Möglichkeit, die Reaktionsgeschwindigkeit zu verfolgen.

$$\text{Glucose} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Hexokinase, } Mg^{2+}} \text{Glucose-6-phosphat} + \text{ADP} + H^+$$

Der Vorteil dieser Methode lag darin, daß die optische Dichte der Lösung keine Rolle spielte und mit größeren Mengen an Hämolysat gearbeitet werden konnte. Es entfiel gegenüber dem optischen Test auch die angeschlossene Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Reaktion, was den Ansatz erheblich vereinfachte und verbilligte. Die pH-Stat-Methode wurde daher zum Austesten der Fraktionen aus der DEAE-Cellulose-Säulenchromatographie gewählt. Sie bewährte sich dabei recht gut und zeichnete sich durch eine große Empfindlichkeit aus. (Reaktionsgeschwindigkeiten von $1 \cdot 10^{-7}$ Mol/Min. konnten noch gut gemessen werden). Daher wurde sie dann auch für die Versuche mit 2.3-DPG- und Citrat-Puffer verwendet. Die Titration wurde in einem thermostatisierten doppelwandigen Glasgefäß durchgeführt und als Temperatur wurden 37° C gewählt, um eine größere Reaktionsgeschwindigkeit zu erreichen. Gerber und Schultze hatten die Hexokinasereaktion bei pH 8,1 gemessen, ein Wert, der in den Erythrozyten sicher nicht vorliegt. Um bei den Messungen möglichst optimale Bedingungen einhalten zu können, wurde in 2.3-DPG-freien Hämolysaten die Hexokinaseaktivität bei verschiedenen pH-Werten gemessen (Abb. 22) und daraus das pH-Optimum bei pH 7,6 gefunden. Bei diesem pH-Wert wurden alle Aktivitätsbestimmungen durchgeführt. Zunächst war die Konzentration des 2.3-DPG und des Citrats wieder zu 20 mM gewählt worden.

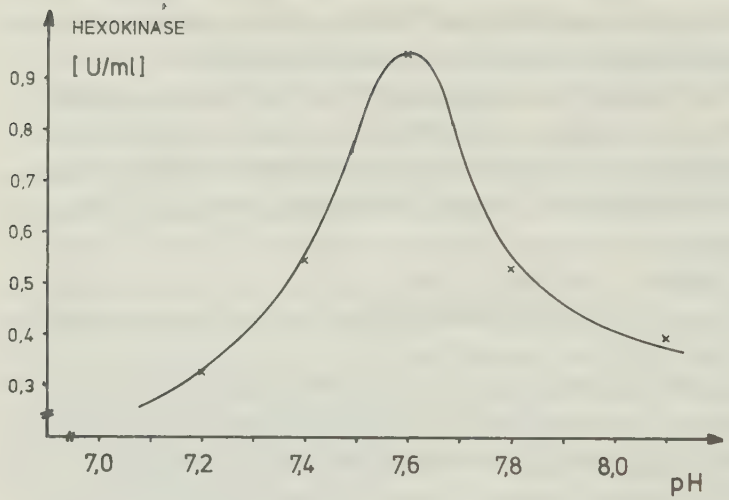


Abb. 22:
pH-Optimum der Erythrozytenhexokinase

Es stellte sich aber heraus, daß dabei die Hemmung der Erythrozytenhexokinase schon so stark war, daß einzelne Werte nicht mehr bestimmt werden konnten und die Versuche wurden daher mit 10 mM Puffern wiederholt. Da außerdem die ATP-Konzentration im Ansatz 3,5 mM war, konnte die Bildung des ATP-Magnesiumkomplexes nicht mehr außer acht gelassen werden, und die im Abschnitt 3. 6. 1. benutzten Formeln zur Berechnung der Magnesiumkonzentrationen mußten um einen entsprechenden Term erweitert werden. Die Komplexbildungskonstanten für das Magnesium-ATP finden sich bei Martell und Schwarzenbach (53) und betragen $\log K^{Mg}_{MgZ} = 4,00$ und $\log K^{Mg}_{MgHZ} = 2,00$. Da bei pH 7,6 mehr als 90 % des ATP als fünffach negativ geladenes Anion vorliegen, konnte die Bildung des re-

lativ schwachen protonierten Komplexes bei der Berechnung vernachlässigt werden. Damit erhielten die Gleichungen folgende Form, wobei die gleichen Symbole wie in Abschnitt 3.6.1. verwendet wurden:
Magnesium-Citrat-Puffer:

$$[Mg]_t = b + \frac{[Citrat]}{1 + \frac{1}{b \cdot K_{Ass}}} + \frac{[ATP]}{1 + \frac{1}{b \cdot K_{Ass}}}$$

Magnesium-2.3-DPG-Puffer:

$$[Mg]_t = b \cdot \left[1 + \frac{[2.3\text{-DPG}]}{1 + \frac{1}{a} + bK_I + \frac{bK_{II}}{a}} \left(K_I + \frac{K_{II}}{a} \right) \right] + \frac{ATP}{1 + \frac{1}{b \cdot K_{Ass}}}$$

Über die Ergebnisse der Messungen geben die Abb. 23 und 24 Auskunft. Im Gegensatz zur Hefehexokinase, wo eine geringe Hemmung beobachtet wurde, hat das Citrat bei genügendem Angebot an Magnesium praktisch keinen Einfluß auf die Aktivität der Erythrozytenhexokinase. Erstaunlich ist, daß die Hemmwirkung, die beim Übergang zu pMg=3 eintritt, den gleichen Wert auch bei pMg=4 beibehält. Zwischen einer Magnesiumionenkonzentration von 10^{-2} M und 10^{-3} M wird der größte Einfluß auf die Aktivität der Erythrozytenhexokinase beobachtet. Das ist besonders interessant, weil die Konzentration an freien Magnesiumionen in den Erythrozyten ca. 1 mM sein dürfte, wobei sie um diesen Wert schwankt, je nachdem ob das Hämoglobin oxygeniert oder desoxygeniert ist. Aus Abb. 24 wird deutlich, daß ein außerordentlich großer Einfluß der 2.3-DPG-Konzentration existiert, der gerade bei dieser Magnesiumionenkonzentration besonders augenfällig ist. Betrachtet man das Verhältnis der Aktivitäten bei pMg=3 zwischen einer 2.3-DPG-Konzentration von 10 mM und 20 mM, so findet man, daß die Hexokinaseaktivität um den Faktor 6 abgenommen hat. Auch diese 2.3-DPG-Konzentrationen liegen genau in dem Bereich der physiologischen Werte, so daß insgesamt gesagt werden kann, daß sich die Hexokinase in den

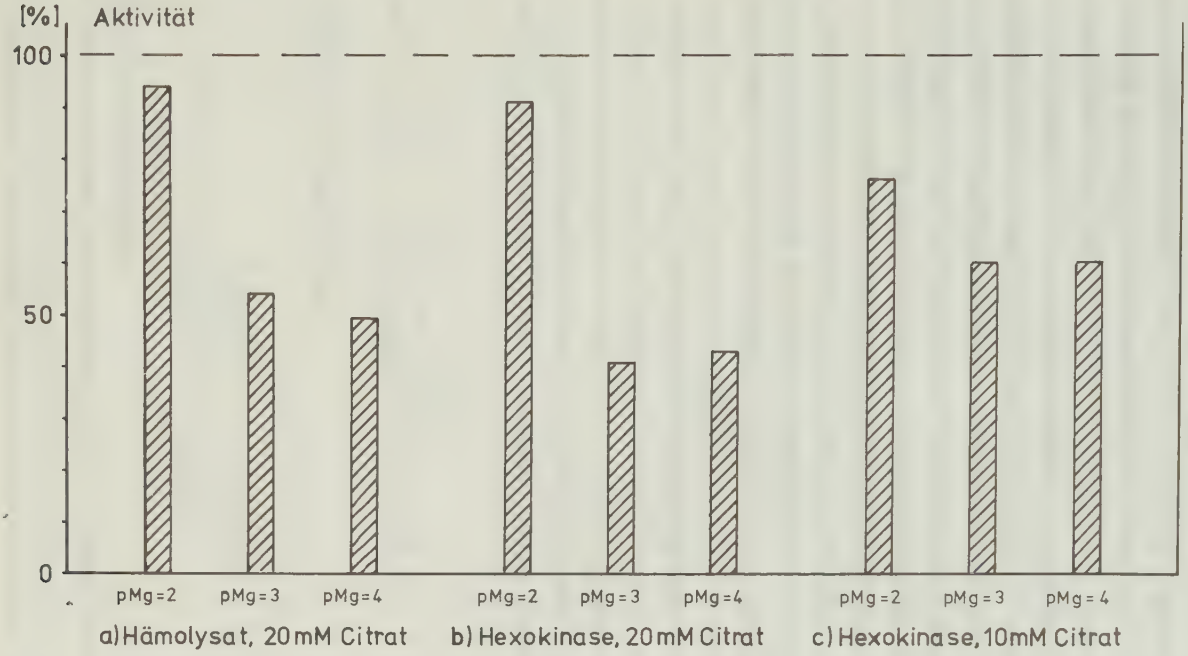


Abb. 23:

Einfluß von Citrat- und Magnesiumionenkonzentration auf die Aktivität von Erythrozytenhexokinase

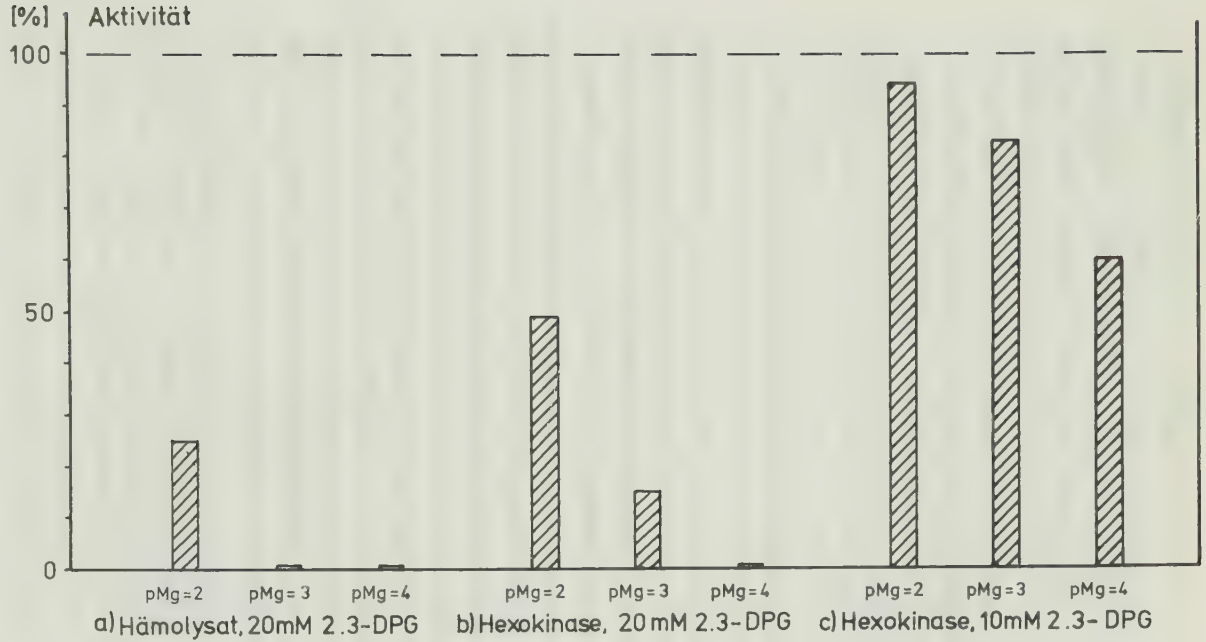


Abb. 24 :

Einfluß von 2.3-Diphosphoglycerat- und Magnesiumionenkonzentration auf die Aktivität der Erythrozytenhexokinase

Erythrozyten in einem Zustand befindet, in dem sie außerordentlich empfindlich auf geringe Änderungen der Magnesium- und 2.3-DPG-Konzentrationen reagiert. Bedenkt man welche lebenswichtige Funktion dem sauerstofftransportierenden System zukommt, so ist es nicht verwunderlich, wenn hier besonders leistungsfähige Regulationsmechanismen eingreifen. (Es ist früher sogar vermutet worden, daß dabei eine hormonale Regelung eingreift, was sich aber nicht bestätigt hat. Eine Hormonwirkung konnte demgegenüber für das System CO_2/HCO_3 von Siegmund und Mitarbeitern (54) bei Vögeln nachgewiesen werden).

In der Einleitung wird das Beispiel der Höhenanpassung angeführt. Nimmt man an, daß das auslösende Moment eine geringere Sauerstoffbeladung des Hämoglobins ist, so folgt daraus, daß durchschnittlich mehr 2.3-DPG gebunden bleibt, was eine höhere Magnesiumionenkonzentration bedingt. Beides bewirkt eine höhere Aktivität der Hexokinase und vermehrte Bildung von 2.3-DPG. Nun bleibt der Sauerstoffpartialdruck der Luft bis zu Höhen von etwa 4.000 m oberhalb von 100 Torr, also in einem Bereich, in dem nur eine sehr geringe Abhängigkeit der Sauerstoffsättigung des Hämoglobins zu beobachten ist. So können auch die Änderungen der 2.3-DPG- und Magnesiumkonzentrationen nur außerordentlich gering sein und nur ein sehr empfindlicher Regelmechanismus ist in der Lage, darauf zu reagieren. Als weiteres Moment kommt dazu, daß sich der pH-Wert des Blutes bei Hyperventilation erhöht, was im Falle der Hexokinase eine Annäherung an das pH-Optimum des Enzyms bedeuten würde (vgl. Abb. 22).

Auch bei Erkrankungen der Lunge und bei Anämien werden oft typische Änderungen der 2.3-DPG-Konzentration beobachtet, die wohl auf ähnliche Mechanismen zurückzuführen sind (66, 67, 68).

4. Ergebnisse und Diskussion (Teil II)

Wie Holke und Siegmund zeigten (23, 24), wird durch Parathormon die Carboanhydrase-Aktivität in den Nieren von Ratten und Hähnchen beträchtlich gesteigert. Auf Grund der Beobachtung von Chase und Aurbach (55), daß Parathormon zu einer Erhöhung der Konzentration von cycl. AMP in den Nierenzellen und zur Aktivierung einer membrangebundenen Adenylcyclase führt (56, 57), war mit einer Mitwirkung des cycl. AMP bei der Parathormonwirkung auf die Nierencarboanhydrase zu rechnen. Der Nachweis dafür gelang dadurch, daß der gleiche Effekt auch durch Injektionen von Dibutyryl-cycl. AMP hervorgerufen werden konnte. (Das 6-N-2'0-Dibutyryl-Derivat kann leichter in die Zelle eintreten).

Bei einer hormonalen Stimulierung von Enzymen, die durch eine Steigerung der intrazellulären Konzentration von cycl. AMP vermittelt wird, muß außer mit der Aktivierung einer weniger aktiven Form des Enzyms durch Phosphorylierung mit Hilfe einer vom cycl. AMP (direkt oder indirekt) abhängigen Kinase auch mit einer de novo Synthese des Enzymproteins gerechnet werden (20). Der zweite Mechanismus konnte im Falle der Parathormonwirkung auf die Nierencarboanhydrase dadurch ausgeschlossen werden, daß durch vorangehende Injektion von Actinomycin D, einem wirksamen Inhibitor der Proteinbiosynthese, die Hormonwirkung auf die Carboanhydrase nicht unterbunden wurde. Zur genaueren Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Parathormon, cycl. AMP und Carboanhydrase in der Niere war daher als Arbeitshypothese das von Sutherland beschriebene "second messenger" -Modell zugrunde zu legen (vgl. Abschnitt 1. 2), wonach eine nicht oder weniger aktive Vorstufe der Carboanhydrase existieren müßte. Die Änderung der physikalischen Eigenschaften des Enzymproteins bei einer solchen Aktivierung dürften nur gering sein und eine Trennung von Vorstufe und aktiviertem Enzym bedarf sicher einer sehr

leistungsfähigen Separationsmethode.

4.1. Isoenzyme der Carboanhydrase +)

Das wohl zur Zeit beste Verfahren zur Trennung und Reinigung von Isoenzymen ist die Elektrofokussierung. Bei dieser Methode macht man sich die Tatsache zunutze, daß sich Ampholyte, wie die Proteine, in einem pH-Gradienten beim Anlegen einer Gleichspannung auf Grund ihrer verschiedenen isoelektrischen Punkte voneinander trennen und sich in der pH-Zone, die ihrem isoelektrischen Punkt entspricht, ansammeln. Zur Erzeugung des pH-Gradienten dienen Trägerampholyte, die aus der Mischung einer großen Anzahl verschiedener aliphatischer Polyamino-polycarbonsäuren von Molekulargewichten unter 1000 bestehen (71, 72). Wesentlich für die Leistungsfähigkeit dieses Trennverfahrens ist die Qualität der Trägerampholyte vor allem insofern als eine möglichst lückenlose und gleichmäßige Verteilung der isoelektrischen Punkte der Bestandteile der Ampholytlösung über den angewandten pH-Bereich erforderlich ist. Wenn diese Voraussetzung erfüllt ist, können noch Proteine voneinander getrennt werden, deren isoelektrische Punkte sich nur um ca. 0,02 pH-Einheiten unterscheiden (58). Beim quantitativen Arbeiten benutzt man spezielle Trennsäulen, die zur Vermeidung von Wärmekonvektionen und zum Schutz der Proteine eine intensive Kühlung erlauben. Zur Stabilisierung dient ein Dichtegradient aus einer ionenfreien Verbindung, z.B. Saccharose, mit dem man die Säule beschickt. Wichtig ist es, daß die Säule eine Entleerung ohne Störung dieses Gradienten und der getrennten Proteinbanden gestattet. Es wurden entweder Säulen nach Haglund (58) benutzt, oder das Säulenelektrophoresesystem "Uniphor" der Fa. LKB, von der auch die Trägerampholyte bezogen wurden. Der Vorteil der Methode, der in ihrer außerordentlichen Trennschärfe liegt, beruht unter anderem darauf, daß eine Konzentrierung der Proteinbanden während der

+) Die in diesem Abschnitt beschriebenen Versuche wurden zusammen mit M. Holke (24) durchgeführt

Durchführung der Elektrofokussierung eintritt, während bei anderen Elektrophorese- und Chromatographiemethoden die Bildung einer scharfen Bande vor dem eigentlichen Verfahren liegt und während der Trennung immer eine Verbreiterung der Banden durch Diffusionsvorgänge zu beobachten ist.

Homogenate von Nieren konnten nach 100 Minuten langem Zentrifugieren bei 105 000 g und Dialyse gegen bidest. Wasser ohne weitere Vorreinigung direkt mit dem Gradienten auf die Trennsäule gegeben werden. Die Nierenhomogenate stammten von Hähnchen, denen zwei Stunden vor Dekapitation und Entnahme der Nieren 400 USP Parathormon pro kg Körpergewicht i. v. injiziert wurden, bzw. von entsprechenden Kontrolltieren. Die Elektrofokussierung dauerte einschließlich der notwendigen langsamen Steigerung der angelegten Spannung, während deren sich der pH-Gradient ausbildete, insgesamt ca. 70 Stunden. Diese langsame Spannungssteigerung ist erforderlich, um die Stromstärke und damit die Wärmeentwicklung mit ihrer nachteiligen Wirkung auf den Dichtegradienten und die Stabilität der Enzyme gering zu halten. Nach Ausbildung des pH-Gradienten - das heißt Trennung der Komponenten des Trägerampholyten - ist die Stromstärke auch bei Spannungen bis 1200 V mit ca. 1mA nur noch sehr gering. Nach der Trennung wurden die Säulen mit Hilfe einer Peristaltikpumpe mit einer Geschwindigkeit von nicht mehr als 2 ml/Minute in einen gekühlten Fraktionssammler entleert und die Carboanhydraseaktivität in den einzelnen, ca. 2 bis 2,5 ml großen Fraktionen bestimmt. Das Elutionsdiagramm gibt Abb. 25 wieder. Die Hauptbande, gegenüber der die kleine davor liegende Bande überhaupt nicht ins Gewicht fällt, scheint abgesehen von einer in Richtung niedriger pH-Werte liegenden Schulter ein einheitliches Protein zu sein. Es ergab sich praktisch auch kein Unterschied zwischen der Carboanhydrase aus Nieren von mit Parathormon behandelten Tieren und den Kontrolltieren. Erst eine erneute Elektrofokussierung, der die Fraktionen 24 bis 36 unterworfen wurden, brachte eine Auftrennung der einzelnen Bande in meh-

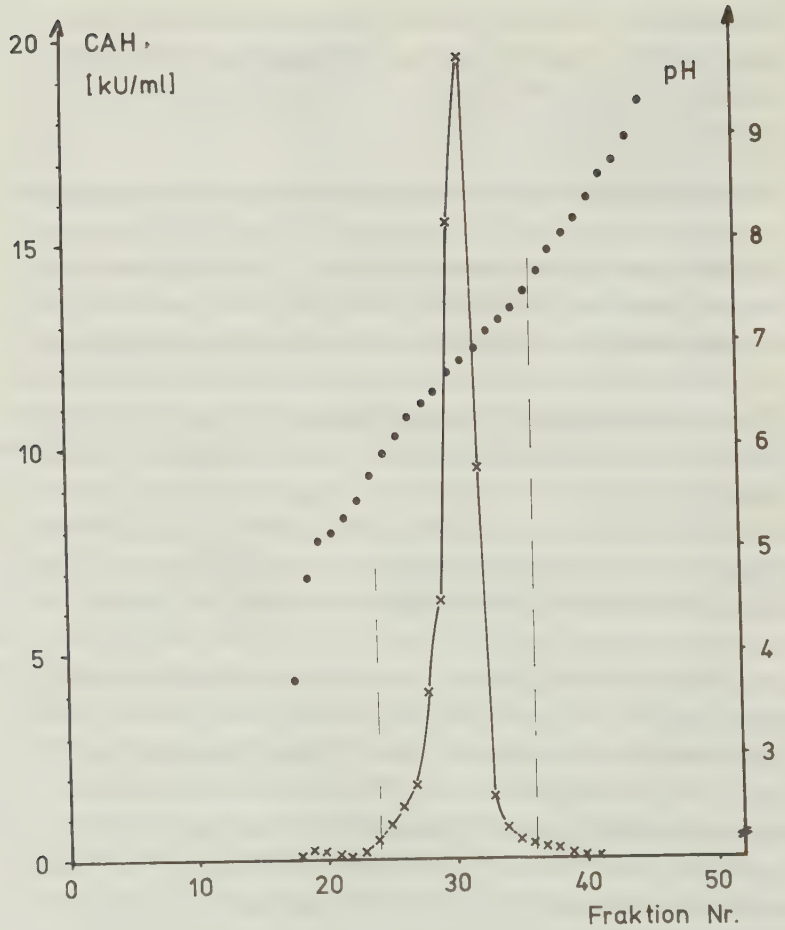


Abb. 25:
Elektrofokussierung von Hühnernieren-Carboanhydrase mit Ampholine (pH-Bereich 5 - 9); Kontrollversuch; die Fraktionen mit CAH-Aktivität wurden einer zweiten Elektrofokussierung unterworfen

rere Komponenten. Hierzu wurde beim ersten Mal die Konzentration des Trägerampholyten so hoch gewählt, daß in diesen Fraktionen genügend Ampholyt für eine zweite Säulenfüllung vorhanden war. So konnte der pH-Bereich von 6,0 bis 7,5 auf die ganze Länge der Säule gedehnt werden. In den Abb. 26 und 27 sind die Ergebnisse solcher zweimaliger Elektrofokussierungen einmal von mit Parathormon behandelten und einmal von Kontrolltieren wiedergegeben. Die einzelne große Bande konnte damit in zwei Isoenzyme der Carboanhydrase aufgespalten werden und es ist zu sehen, daß sich das Verhältnis der Aktivitäten der beiden Isoenzyme nach der Injektion von Parathormon umgekehrt hatte. Die in den Elutionsdiagrammen dargestellten Versuche sind typische Beispiele aus einer Anzahl analoger Versuche.
Dieses Ergebnis ist ein Anzeichen dafür, daß unter dem Einfluß von Parathormon das eine Isoenzym in das andere umgewandelt wurde. Die Lage der aktivierten Bande bei einem kleineren pH-Wert stimmt auch mit der Annahme überein, daß die Aktivierung durch eine unter der Wirkung einer Proteinkinase eingetretenen Phosphorylierung hervorgerufen wurde. (Eine Phosphorylierung dürfte infolge der Einführung einer anionischen Gruppe einer Verschiebung des isoelektrischen Punktes nach einem kleineren pH-Wert entsprechen).

4.2. Bestimmung der Carboanhydrase durch Messung der CO_2-Hydratation

Die Carboanhydrase katalysiert die Hydratisierung von CO_2 zu Kohlensäure, die in wässriger Lösung sehr rasch in H^+ und HCO_3 dissoziiert. Zur Bestimmung der Carboanhydraseaktivität kann daher die Messung der in der Zeiteinheit gebildeten Protonen dienen. Eine einfache Methode, die von Roughton und Booth (59) vorgeschlagen und von Wilbur und Anderson (60) modifiziert wurde, benutzt die durch den Farbumschlag eines Indikators angezeigte Erschöpfung der

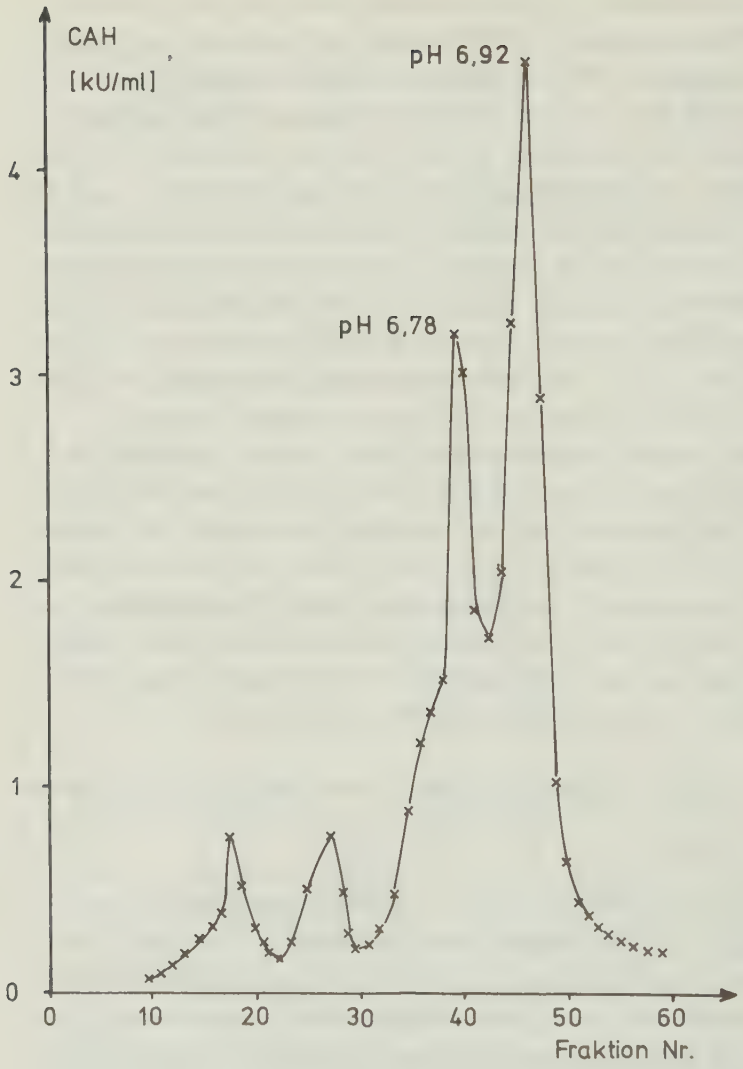


Abb. 26:
Wiederholte Elektrofokussierung von Hühnernieren-CAH;
Kontrollversuch

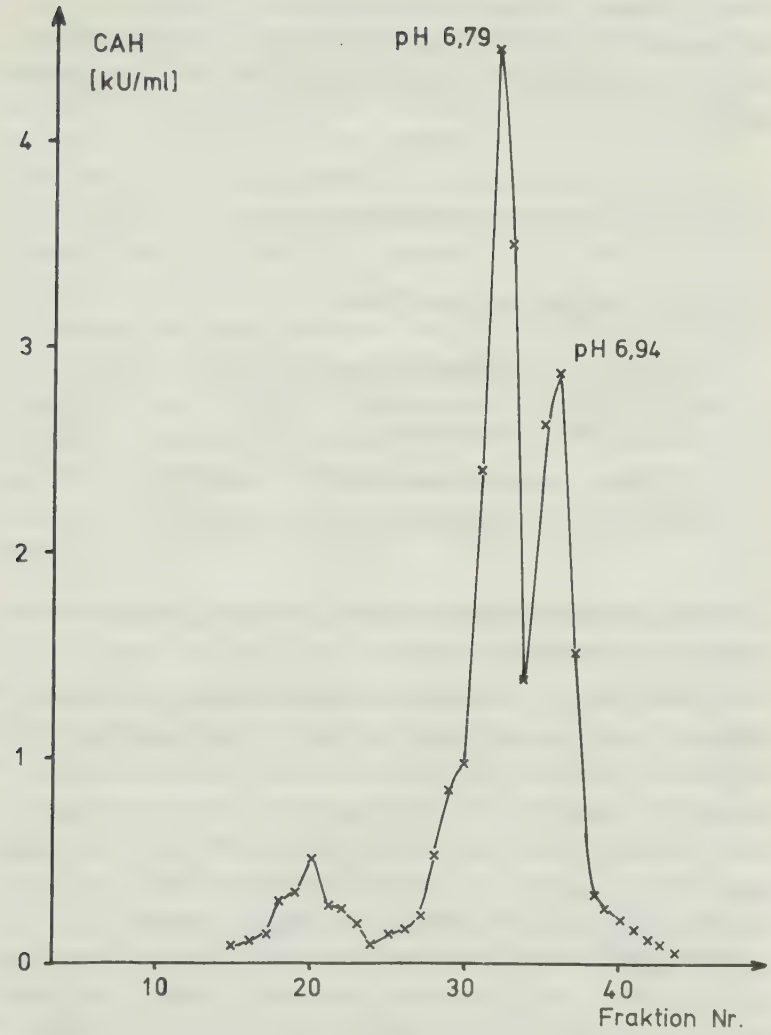


Abb. 27:
Wiederholte Elektrofokussierung von Hühnernieren-CAH nach Injektion von Parathormon

Kapazität eines Veronalpuffers zur Aktivitätsbestimmung. Eine Enzymeinheit ist danach definiert als die Differenz der Zeit der unkatalysierten Reaktion (t_o') und der enzymatisch katalysierten CO_2-Hydratisierung (t_x) dividiert durch t_x, wobei die Reaktion bei 0^o C durchgeführt wurde.

$$\frac{t_o - t_x}{t_x} \equiv \text{"Meldroum-Roughton-Einheit"}$$

Dabei laufen die folgenden Reaktionen ab:

$$CO_2 + H_2O \xrightleftharpoons{\text{(Carboanhydrase)}} H_2CO_3 \qquad (1)$$

$$CO_2 + OH^- \rightleftharpoons HCO_3^- \qquad (2)$$

$$H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^- \qquad (3)$$

$$HCO_3^- \rightleftharpoons H^+ + CO_3^{2-} \qquad (4)$$

Unter den gewählten Bedingungen (pH 8,2) können die zweite und vierte Reaktion vernachlässigt werden.

Unter Berücksichtigung der Geschwindigkeitskonstanten der nicht katalysierten ersten Reaktion, der Löslichkeit des Kohlendioxids in Wasser von 0^o C bei einem Druck von 1 atm und der Konzentration des Puffers läßt sich berechnen, wieviele µMol CO_2 von der Carboanhydrase pro Minute hydratisiert werden. (Eine ausführliche Berechnung findet sich z. B. in (24), sie ergibt einen Faktor von 16,2 , mit dem die Meldroum-Roughton-Einheiten zu multiplizieren sind). Die so erhaltenen Einheiten lassen sich mit internationalen Enzymeinheiten besser vergleichen, entsprechen diesen aber nicht hinsichtlich der Temperatur und der Forderung nach Sättigung des Enzyms mit Substrat.

4.3. Bestimmung der Esteraseaktivität der Carboanhydrase

Die Carboanhydrase besitzt neben ihrer Wirkung auf die CO_2-Hydratation noch eine Esteraseaktivität, die bei einigen Versuchen zur besseren Charakterisierung des Enzyms herangezogen wurde. Ihre Bestimmung erfolgte im Photometer unter Verwendung eines von Kaiser und Lo (61, 62) vorgeschlagenen Substrats, dem 2-Hydroxy-5-nitro-α-toluolsulfonsäuresulton, das nach Spaltung der innermolekularen Sulfonsäureesterbindung eine gelbe Farbe annimmt. Da das Substrat in Lösung nicht sehr beständig ist, wird immer die Differenz zu einem Vergleichsansatz ohne Enzym angegeben. Die Wirkung der Carboanhydrase auf die Hydrolyse dieses etwas ausgefallenen Substrats ist etwa 100 mal größer als auf die von p-Nitrophenylacetat und ermöglicht daher einen Test mit geringeren Enzymmengen (64). Bei der Versuchsauswertung wurde als Enzymeinheit die Menge an Enzym angesehen, die unter den Versuchsbedingungen (Abschnitt 6.20) 1 µMol Sulton pro Minute hydrolysierte.

Bei der Bestimmung der Esteraseaktivität zeigte sich, daß ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Isoenzymen im Verhältnis ihrer Carboanhydrase- zur Esteraseaktivität besteht. In Abb. 28 ist das Elutionsdiagramm eines Kontrollversuches wiedergegeben, bei dem die Fraktionen auch auf ihre Esteraseaktivität getestet wurden. Wieder sind zwei Banden zu erkennen, die bei den gleichen pH-Werten auftreten wie in Abb. 26, deren Auftrennung hier allerdings nicht ganz so gut war. Ihre Aktivitäten verhalten sich genau umgekehrt zu den Verhältnissen bei der Carboanhydrasebestimmung und die Bande mit dem niedrigeren isoelektrischen Punkt besitzt demnach eine bedeutend höhere Esteraseaktivität als die zweite Bande.
Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal der beiden Isoenzyme ergab sich bei der Untersuchung des Einflusses von verschiedenen Anionen auf die Esteraseaktivität. Als Beispiel zeigt Abb. 29 wie sich die Aktivitäten der Banden aus dem in Abb. 26 dargestellten Versuch verhalten, wenn bei gleicher Puffergesamtkonzentration von dem normalerweise

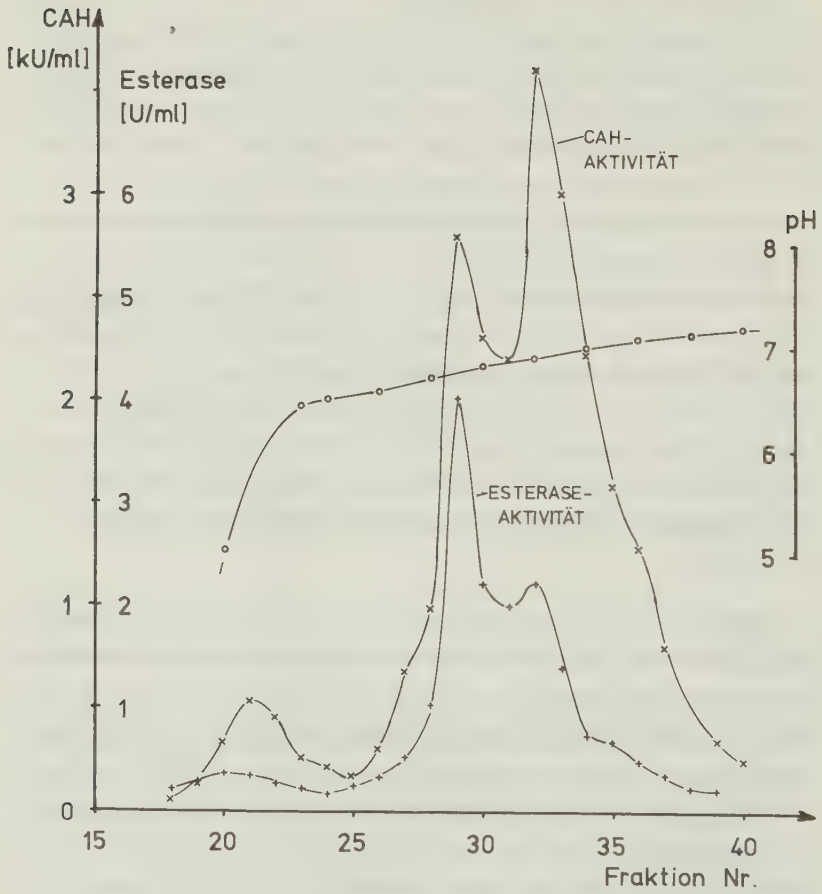


Abb. 28:
Wiederholte Elektrofokussierung von Hühnernieren-Carboanhydrase; Kontrollversuch; getestet auf Esterase- und Carboanhydrase-Aktivität

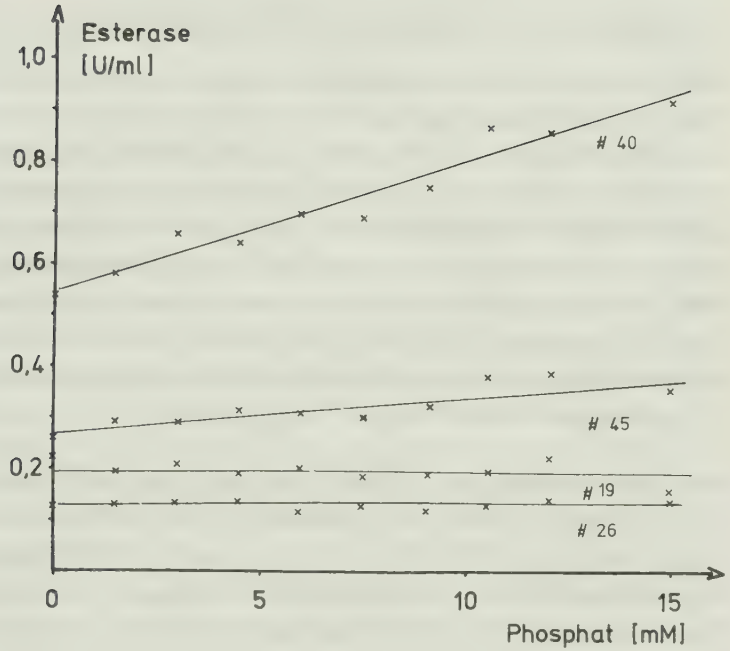


Abb. 29:

Einfluß von Phosphationen auf die Esterase-Aktivität der Carboanhydrase aus Hühnernieren. Die einzelnen Fraktionen stammen aus dem Versuch der Abb. 26.

benutzten N-Morpholinopropansulfonsäure-Puffer +) nach und nach auf Phosphatpuffer übergegangen wurde. Es trat eine beträchtliche Erhöhung der Aktivität bei dem Isoenzym auf, das nach Parathormoninjektion vermehrt war, während dieser Effekt bei dem anderen Isoenzym bedeutend geringer war.

4.4. Aktivierung der Carboanhydrase in Nierenhomogenaten

Nachdem eine teilweise Auftrennung der Nierencarboanhydrase von Hähnen in zwei Isoenzyme gelungen war, war es von Interesse, weitere Informationen über den der Aktivierung zugrunde liegenden Mechanismus zu erhalten. Gesichert war, daß Parathormon nicht nur eine Erhöhung der Konzentration des cycl. AMP in Nierenzellen, sondern auch eine Steigerung der Aktivität der Nierencarboanhydrase bewirkt. Für die Gültigkeit des "second messenger"-Modells von Sutherland konnte angeführt werden, daß Dibutyryl-cycl. AMP in vivo die gleiche Wirkung wie das Hormon hatte und daß diese durch Actinomycin D nicht unterbunden wurde (24).

Sutherland und Mitarbeiter verwendeten für die Bestimmung des cycl. AMP ein Nierenhomogenat, das 20 Minuten lang bei 12 500 g zentrifugiert worden war, als Präparation einer von cycl. AMP abhängigen Proteinkinase (81). Zur Untersuchung der durch das cycl. AMP bewirkten Aktivierung von Nierencarboanhydrase wurden daher Homogenate von Hühnernieren hergestellt und unter verschiedenen Bedingungen mit cycl. AMP in Gegenwart von ATP inkubiert. Solche Versuche in

---

+) Bei Enzymuntersuchungen erweisen sich Puffer mit solchen großen Ionen, wie die hier benutzte N-Morpholinopropansulfonsäure, oft als vorteilhaft, da sie nur in geringem Ausmaß von Proteinen gebunden werden und daher auch die Enzymaktivitäten weniger beeinflussen.

vitro bieten oft eine Reihe von Vorteilen gegenüber Versuchen am intakten Organismus. Man hat es mit einem einfacheren System zu tun, Einflüsse, die z.B. über andere Organe erfolgen könnten, können leichter ausgeschaltet werden und es besteht keine Schwierigkeit, bestimmte Parameter in gewünschter Weise zu verändern.

Es wurden jedoch etwas andere Versuchsbedingungen als die von Sutherland benutzt. Die Nieren wurden stets in Tris/Sulfat-Puffer vom pH 7,4 homogenisiert (Sulfationen haben einen geringeren Einfluß auf die Carboanhydrase als Chloridionen), der Magnesiumsulfat und Theophyllin enthielt. Das Theophyllin ist ein Inhibitor der Phosphodiesterase (63), die unter physiologischen Bedingungen für die Spaltung des cycl. AMP und für das Funktionieren eines Regelmechanismus notwendig ist. Bei in vitro-Versuchen deutet eine Verstärkung des Effekts eines Hormons in Gegenwart von Theophyllin daher auf die Mitwirkung von cycl. AMP hin. Das Homogenat ließ sich für die Versuche nicht ohne weiteres verwenden, da es noch Zelltrümmer enthielt, die trotz Verwendung eines Schüttelwasserbads während der Inkubation sedimentierten und so Inhomogenitäten verursachten und Schwierigkeiten bei der Benutzung von µl-Pipetten machten. Es wurde daher vor dem Versuch 10 Minuten lang bei 800 g zentrifugiert.
Abb. 30 zeigt, daß die Carboanhydraseaktivität um 27 % gegenüber einem ATP-enthaltenden Vergleichsansatz gesteigert wurde, wenn das Zentrifugat mit cycl. AMP und ATP bei 30° C inkubiert wurde.
Bei weiteren Versuchen wurden die Homogenate analog dem Vorgehen bei der Fraktionierung von Zellbestandteilen in isotonen Puffer-Saccharose-Lösungen hergestellt und zentrifugiert. Bei 800 g werden dabei Zellkerne und Fragmente der Zellmembranen abgetrennt.
10 Minuten langes Zentrifugieren bei 8 000 g führt darüber hinaus zur Sedimentation der Mitochondrien und durch 100 Minuten lange Zentrifugation bei 105 000 g wird die sogenannte Mikrosomenfraktion sedimentiert, die hauptsächlich aus Fragmenten des endoplasmatischen Redikulums und Ribosomen besteht.

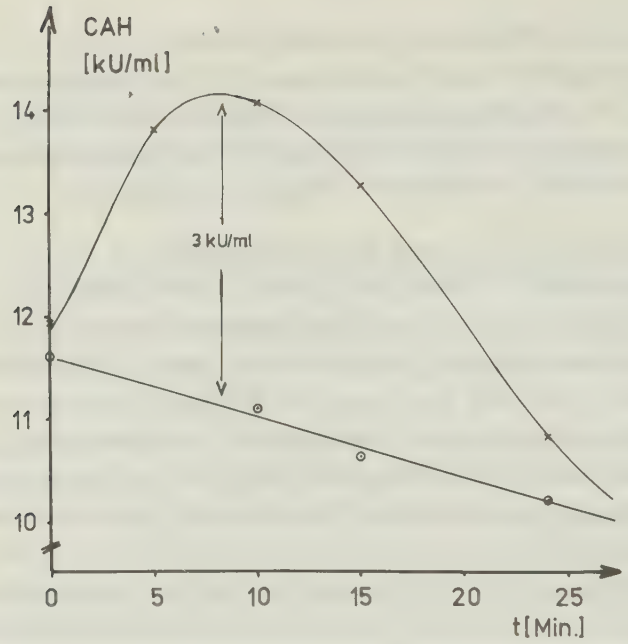


Abb. 30

800 g Überstand eines 20%igen Nierenhomogenats in 40 mM Tris/H_2SO_4-Puffer, pH 7,4,
der 2 mM an Theophyllin und 3 mM an $MgSO_4$ ist;
Inkubation bei 30^{o} C

x — x 1,6 mM ATP und 0,5 mM cAMP

o — o 1,6 mM ATP

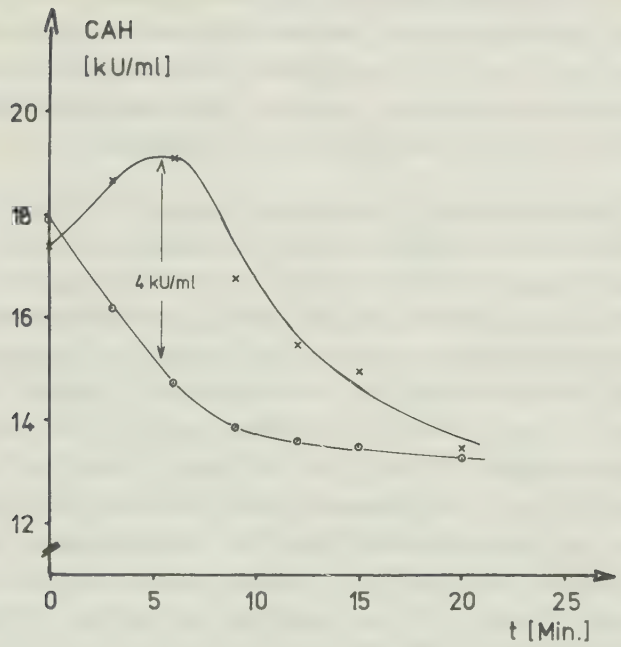


Abb. 31

800 g Überstand eines 20%igen Nierenhomogenats in 40 mM Tris/H_2SO_4-Puffer, pH 7,4,
der 0,4 M an Saccharose, 2 mM an Theophyllin und 3 mM an $MgSO_4$ ist;
Inkubation bei 30° C

x —— x 1,6 mM ATP und 0,5 mM cAMP
o —— o 1,6 mM ATP

Abb. 31 zeigt die Wiederholung des Aktivierungsversuches in 0,4 M Saccharose enthaltenden Puffer. Die Aktivierung beträgt wieder 28% gegenüber dem Vergleichswert, bei beiden Kurven fällt die Aktivität aber sehr schnell unter den Ausgangswert. Ein direkter Angriff auf die aktivierte Carboanhydrase, vermutlich die Wirkung einer Proteinphosphatase, dürfte hier die wahrscheinlichste Erklärung sein.

Um die Reaktionen etwas zu verlangsamen, das heißt auch die Zeit der Aktivierung zu verlängern, wurde bei allen folgenden Ansätzen als Versuchstemperatur 20^{o} C gewählt. Wie Abb. 32 zeigt, ergab sich keine große Veränderung der Ergebnisse. Liegt der Aktivierung der Carboanhydrase der von Sutherland als allgemein gültig postulierte Mechanismus zu Grunde, ist für die Wirkung cycl. AMP und ATP erforderlich. Daher wurden Parallelversuche angesetzt, bei denen neben einem Vergleichswert ohne cycl. AMP und ATP einmal nur ATP und einmal nur cycl. AMP zugegeben wurde. ATP allein hatte keinen Effekt auf die Carboanhydraseaktivität, cycl. AMP allein hatte einen geringen Effekt, vermutlich weil der Ansatz aus dem Homogenat noch endogenes ATP enthielt. Die nur kurzfristige sehr geringe Aktivierung beim Zusatz von cycl. AMP allein ließ vermuten, daß die Konzentration von ATP auch in den Ansätzen, deren Puffer ca. 2 mM ATP enthielt, wegen eines beträchtlichen ATPase-Gehaltes der Homogenate zu schnell abfiel. Daher wurde zur Nachlieferung von ATP Kreatinphosphat und Kreatinphosphokinase zugegeben, ein System, das von G. Schulz und Mitarbeitern (65) verwendet wurde. Es ist in Abb. 33 zu sehen, daß damit eine länger dauernde Aktivierung eintrat und daß der Verlust an Carboanhydraseaktivität beim Vergleichsansatz unterblieb.

Von Carboanhydrase aus menschlichen Erythrozyten war bekannt, daß sie eine SH-Gruppe enthält, die sich ca 14 Å vom Zinkatom entfernt befindet (76, 77). Obwohl sie damit nicht unmittelbar am katalytischen Geschehen beteiligt ist, schien es angebracht, beim Homogenisieren

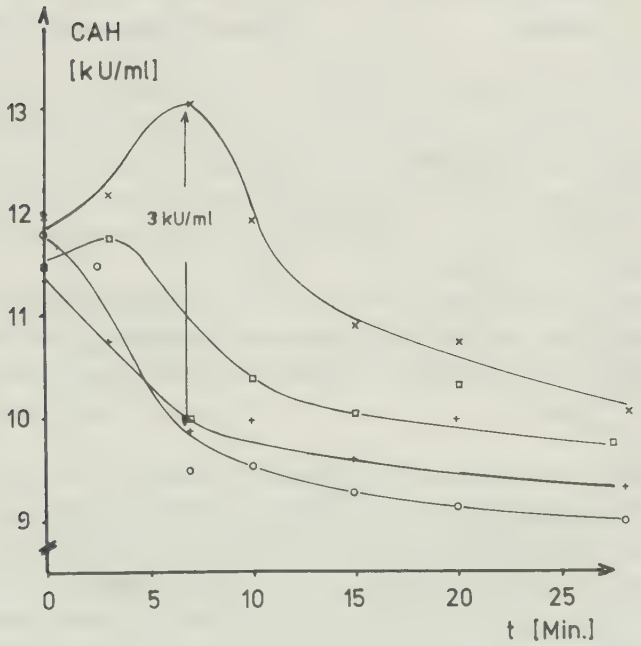


Abb. 32

8 000 g Überstand, Homogenat wie in Abb. 31,
Inkubation bei 20° C

x —— x 1,9 mM ATP und 0,67 mM cAMP
□ —— □ 0,67 mM cAMP
\+ —— + 1,9 mM ATP
○ —— ○ ∅ ATP und ∅ cAMP

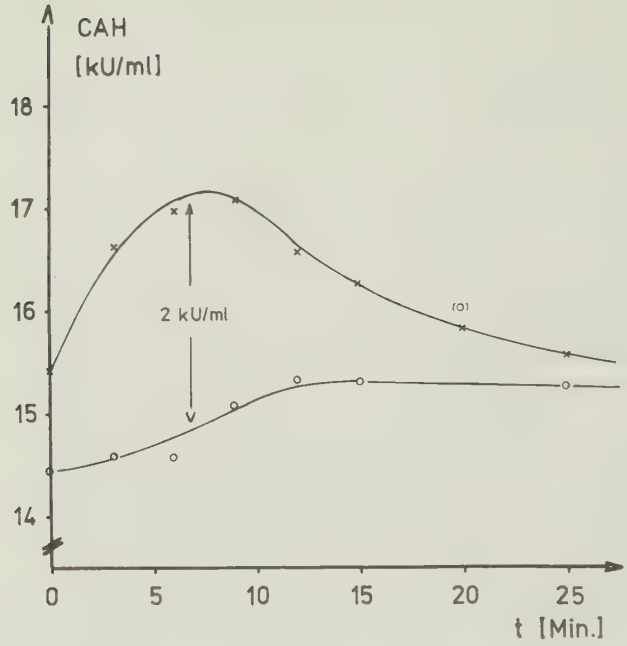


Abb. 33

8 000 g Überstand, Homogenat wie in Abb. 31,
Inkubation bei 20° C

x —— x 1,9 mM ATP, 28 mM CP, 0,19 mg/ml CPK und 0,65 mM cAMP

o —— o 1,9 mM ATP, 28 mM CP, 0,19 mg/ml CPK

der Hühnernieren SH-Gruppen-haltige Verbindungen zuzugeben. Es stellte sich heraus, daß bei Verwendung von Puffern, die 1 mM Dithioerythrit enthielten, die Stabilität des Enzyms verbessert werden konnte und daher sind bei den anschließend beschriebenen Versuchen die Aktivitäten insgesamt etwas größer.

Auch bei der Esteraseaktivität der Carboanhydrase konnte durch cycl. AMP und ATP eine Steigerung hervorgerufen werden, wie dies in Abb. 34 zu sehen ist. In diesem Fall wurde auch die Konzentration des cycl. AMP, die bei den vorherigen Versuchen mit 0,5 mM recht hoch war, auf 0,05 mM verringert, was sich als ausreichend erwies.

Abb. 35 schließlich zeigt einen Versuch mit einem bei 105 000 g gewonnenen Zentrifugat, der keine Verbesserung gegenüber den bisher benutzten Versuchsansätzen brachte. Auch hier kommt es nur zu einer kurzzeitigen Aktivierung des Enzyms.

Aus den in den Abb. 30 bis 35 wiedergegebenen Versuchen zur Aktivierung der Carboanhydrase in Nierenhomogenaten ist zu sehen, daß sich eine auffällige Verbesserung dann ergab, wenn dafür gesorgt wurde, daß die Konzentration des ATP nicht zu schnell abnehmen konnte. Daraus konnte geschlossen werden, daß für die Verringerung der ATP-Konzentration, die sich aus diesen Beobachtungen ergab, eine in den Homogenaten vorhandene ATPase-Aktivität verantwortlich war. Da die Gegenwart von Calciumionen eine Voraussetzung für die Funktion eines wesentlichen Teils der ATPase-Aktivität ist (vgl. z. B. 80), sollte es möglich sein, diesen Einfluß durch Bindung der Calciumionen auszuschalten. Das gelang mit Hilfe von Äthylenglykol-bis-ß-aminoäthyläther-N. N. N' N' -tetraessigsäure (EGTA), einem Komplexbildner, mit dem Calciumionen maskiert werden können, ohne dabei gleichzeitig die Konzentration an freien Magnesiumionen, die für die Kinasewirkung erforderlich ist, zu beeinträchtigen. Die Stabilitätskonstante

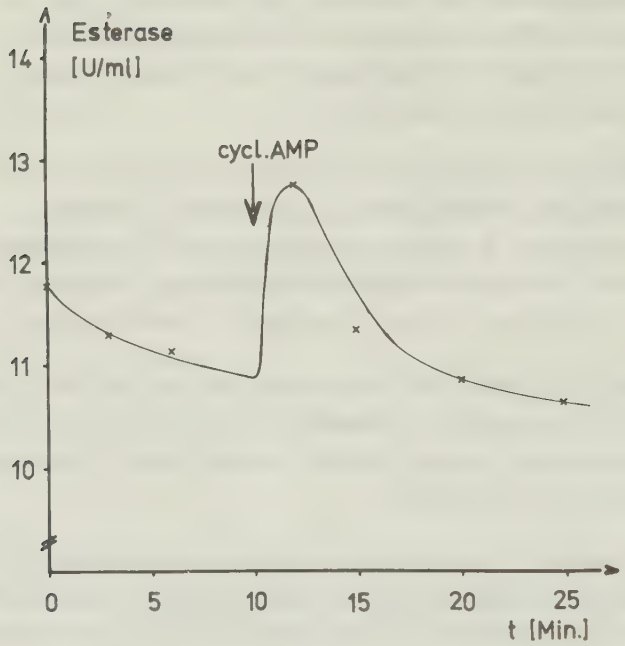


Abb. 34

8 000 g Überstand eines 25%igen Hühnernierenhomogenats in 30 mM Tris/H_2SO_4-Puffer, pH 7,4, der 0,2 M an Saccharose, 2 mM an Theophyllin, 1 mM an Dithioerythrit und 7,5 mM an $MgSO_4$ist; Inkubation bei 20° C, Bestimmung der Esteraseaktivität der Carboanhydrase

x —— x 4 mM ATP, nach 10 Minuten Zugabe von cAMP (50 µM im Ansatz)

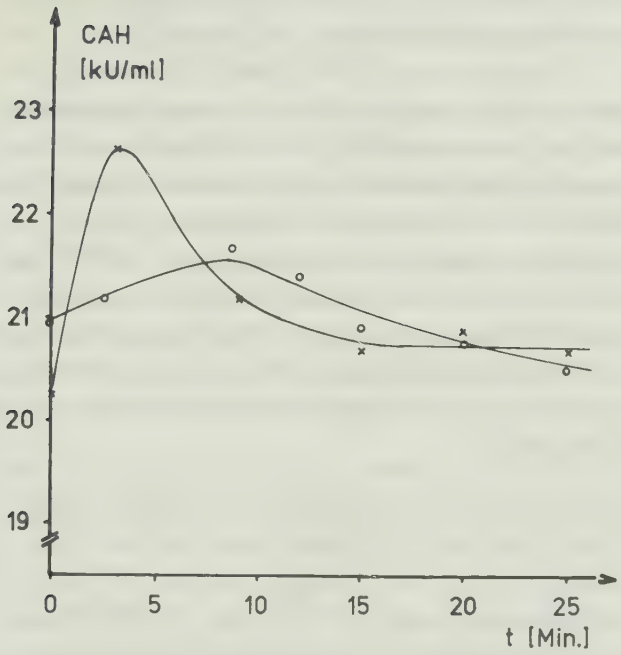


Abb. 35

100 000 g Überstand, Homogenat wie bei Abb. 34
Inkubation bei 20° C

x —— x 4 mM ATP, 30 mM CP, 0,2 mg/ml CPK, 50 µM cAMP
o —— o 4 mM ATP, 30 mM CP, 0,2 mg/ml CPK

für den Calciumkomplex beträgt $K^M_{MZ} = 10^{11,0}$, der eine solche für den Magnesiumkomplex von $10^{5,2}$ gegenübersteht. Nach der Definition der Komplexbildungskonstanten $K^M_{MZ} = \frac{[MEGTA^{2-}]}{[M^{2+}] \cdot [EGTA^{4-}]}$ sind diese Werte nicht ohne weiteres auf die Verhältnisse in der auf pH 7,4 gepufferten Lösung anzuwenden, da in die Gleichung die Konzentration des vollständig dissoziierten EGTA-Moleküls eingeht. Die beiden durch Protonierung des Stickstoffs entstandenen sauren Gruppen haben beim EGTA Dissoziationskonstanten von $K_3 = 10^{-8,85}$ und $K_4 = 10^{-9,46}$ (31) und liegen daher bei dem pH-Wert des benutzten Puffers nur zum Teil dissoziiert vor. Nach Chaberek und Martell (78) ist die pH-abhängige Konzentration des vollständig dissoziierten Komplexbildners durch Division durch einen Faktor α zu erhalten, der folgendermaßen definiert ist:

$$\alpha = \frac{[H^+]^4}{K_1 \cdot K_2 \cdot K_3 \cdot K_4} + \frac{[H^+]^3}{K_2 \cdot K_3 \cdot K_4} + \frac{[H^+]^2}{K_3 \cdot K_4} + \frac{[H^+]}{K_4} + 1$$

Wegen der Größenordnung von $K_1 = 10^{-2,0}$ und $K_2 = 10^{-2,68}$ sind die beiden ersten Summanden zu vernachlässigen. Dann erhält man für α bei pH 7,4 den Wert $10^{3,56}$ und aus der Gleichung für die Komplexbildungskonstante ergibt sich, daß K^M_{MZ}/α die Stabilitätskonstante beim pH des Puffers ist. Die Stabilitätskonstante des Magnesiumkomplexes beträgt dann nur noch $10^{1,6}$, das heißt, Magnesiumionen werden praktisch nicht gebunden, da Magnesium und EGTA in Konzentrationen von 10 mM bzw. 12,5 mM eingesetzt waren. Der Calciumkomplex hat dagegen bei diesem pH-Wert eine Stabilitätskonstante von $10^{7,4}$, was bedeutet, das praktisch alle Calciumionen, die durch das Homogenat in den Ansatz kamen, gebunden wurden.

Ein Versuch, bei dem die Nieren in einem Puffer homogenisiert wurden, der 12,5 mM an EGTA war und mit 10 mM eine gegenüber den vorherigen Versuchen etwas höhere Magnesiumkonzentration besaß, zeigte eine Aktivierung der Carboanhydrase, die über mehr als

10 Minuten (bis zum Abbruch der Messungen) erhalten blieb. Auch die Carboanhydraseaktivität des Vergleichswertes (ohne ATP und cycl. AMP) blieb bei diesem Versuch über die gesamte Versuchsdauer konstant. In Abb. 36 sind die Messergebnisse dargestellt. Der Ansatz, der das cycl. AMP enthielt, war darüber hinaus ca. 1 mM an Natriumfluorid, da Wosilait und Sutherland (79) die Hemmung einer Proteinphosphatase durch Fluorid beobachtet hatten. Entscheidend für die bleibende Aktivierung der Carboanhydrase war jedoch die Komplexierung des Calciums. Das ergab sich aus einem weiteren Versuch, der mit Ausnahme des EGTA identisch mit dem vorherigen war. Hierbei ergab sich eine Aktivitätssteigerung von 16, 5 kU/ml auf 18, 5 kU/ml, der nach 10 Minuten ein Abfall der Carboanhydraseaktivität auf den Wert des Vergleichsansatzes folgte.

Das Fluorid übt auch auf die Carboanhydrase eine Hemmwirkung aus, die sich aber bei der Aktivitätsbestimmung nicht bemerkbar machte, da alle Proben nach der Entnahme sofort in die zehnfache Menge eiskalten bidest. Wassers gegeben und bei der anschließenden Aktivitätsbestimmung mit der chronometrischen Methode nochmals 1 : 100 verdünnt wurden. Damit ist auch das Fluorid entsprechend verdünnt worden und zeigt bei dieser Konzentration keine Hemmwirkung mehr. Das läßt sich auch daraus erkennen, daß für beide Ansätze die gleichen Anfangsaktivitäten gemessen wurden.

Alle in diesem Abschnitt beschriebenen Versuche haben eine Aktivierung der Carboanhydrase um 12 bis 16 %, bezogen auf den Ausgangswert, gemeinsam. Sie unterscheiden sich durch die Dauer der Aktivierung, die durch eine gleichbleibende Konzentration von ATP gesteigert werden konnte. Die bei den ersten Versuchen zu beobachtende Abnahme der Aktivität des Vergleichswertes steht im Einklang mit den Befunden bei der Elektrofokussierung und besagt, daß ein Teil der Nierencarboanhydrase in aktivierter, der andere Teil in nicht aktivierter Form vorliegt.

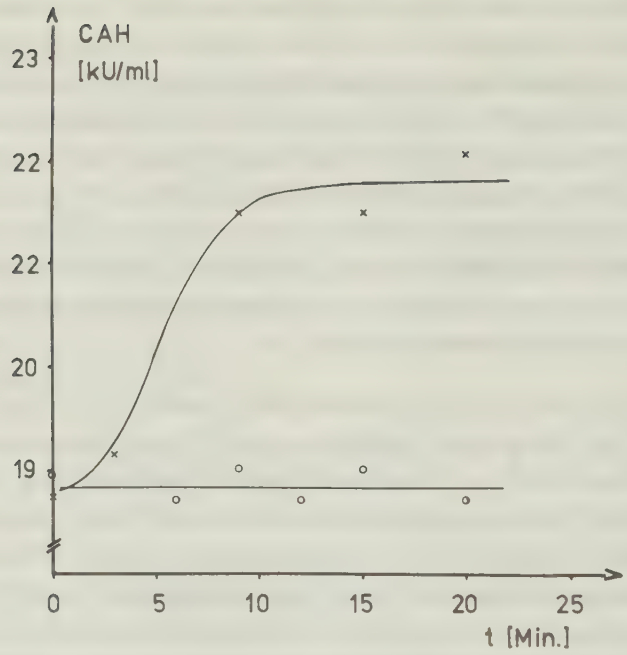


Abb. 36

8 000 g Überstand eines 25%igen Hühnernierenhomogenats in 40 mM Tris/H_2SO_4-Puffer, pH 7,4, der 0,25 M an Saccharose, 1 mM an Dithioerythrit, 12,5 mM an EGTA und 10 mM an $MgSO_4$ist;

x ——x 2,5 mM Theophyllin, 4 mM ATP, 30 mM CP, 0,2 mg/ml CPK, 1,15 mM NaF 50 µM cAMP

o ——o Ø (Puffer)

4.5. Aktivierung von Carboanhydrase-Isoenzymen

Die bisherigen Versuchsergebnisse lassen sich am besten mit der Hypothese deuten, daß die durch Parathormon bewirkte Aktivierung der Carboanhydrase in Hühnernieren durch Phosphorylierung der weniger aktiven Form der Carboanhydrase (Bande II mit einem isoelektrischen Punkt von 6,93) erfolgte, wobei sie in das aktivere Enzym (Bande I mit einem isoelektrischen Punkt von 6,79) überführt wurde (vgl. Abb. 26 und 27).

Es war nun weiter zu prüfen, ob in einem Nierenhomogenat nicht nur die darin vorhandene Carboanhydrase aktiviert wurde, sondern auch die nach Abschnitt 4.1. erhaltenen Isoenzyme. Sie wurden daher in einem Ansatz inkubiert, der ATP, Magnesium und eine Proteinkinase enthielt, die durch Homogenisieren einer Hühnerniere in 0,33 M Saccharoselösung und 20 Minuten langes Zentrifugieren bei 12 500 g nach den Angaben von Sutherland (81) frisch bereitet worden war. Aus den Carboanhydraseaktivitäten von Homogenat und Isoenzymlösungen, sowie den zusammengegebenen Volumina ergab sich, daß im Versuchsansatz ca. 20 % der Aktivität aus dem Homogenat stammte, während die übrigen 80 % der Carboanhydraseaktivität von den zugesetzten Banden herrührten. Nimmt man auf Grund der voranstehend beschriebenen Versuche unter den gewählten Bedingungen eine Aktivierung für die im Homogenat ursprünglich vorhandene Carboanhydrase von etwa 15 % an, so entspricht das einer Steigerung der Aktivität von 0,2 bis 0,3 kU pro ml Ansatz. Die Versuche ergaben (Abb. 37), daß unter Berücksichtigung dieser Korrektur die Aktivität des Isoenzyms II um fast 50 % gesteigert wurde, während die Aktivität von Isoenzym I praktisch unbeeinflußt blieb. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit dem vorgeschlagenen Mechanismus der Carboanhydrase-Aktivierung durch Parathormon. Da hier nur das Homogenat ohne Inhibitoren (Theophyllin, EGTA) und ATP-regenerierendem System verwendet wurde, trat dementsprechend nur eine vorübergehende Aktivierung des Enzyms auf.

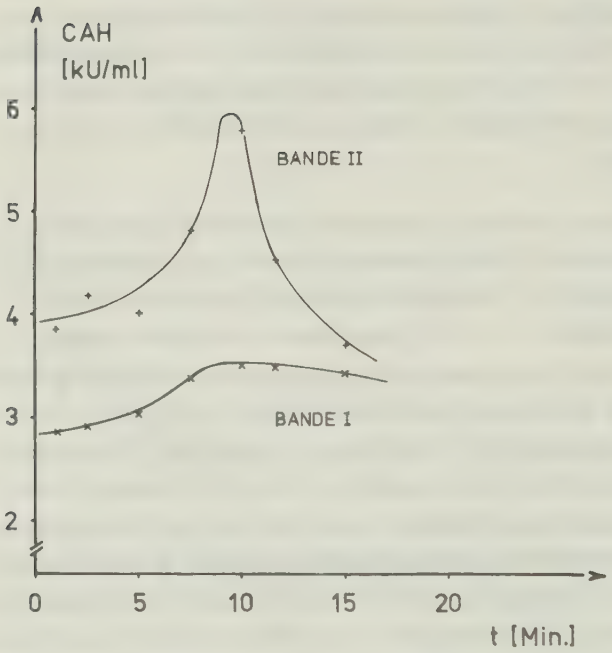


Abb. 37

Inkubation von 0,5 ml der Isoenzyme I (× - ×) und II (+ - +) in
33 mM Mops-Puffer, pH 7,8,
der 1,3 mM an ATP und 1,3 mM an $MgSO_4$ ist,
mit 0,1 ml Hühnernierenhomogenat (25%iges Homogenat in 0,33 M
Saccharose und Zentrifugation bei 12 500 g während 20 Minuten)

5. ZUSAMMENFASSUNG

5.1. Ergebnisse der Untersuchungen über die Wirkung von 2.3-Diphosphoglycerat (2.3-DPG):

a) Die Bildungskonstanten der Erdalkalimetallkomplexe von 2.3-DPG wurden aus pH-Titrationskurven, sowie ihre Bildungswärmen durch direkte Messungen im Mikrokalorimeter bestimmt und daraus ihre Bildungsentropien berechnet. Die Ergebnisse zeigen, daß die Stabilität der Metallkomplexe von 2.3-DPG nur durch das Entropieglied, also vermutlich durch die Abnahme der Ordnung der Hydrathülle bedingt ist.

b) Es wurde gefunden, daß der 2.3-DPG-Magnesiumkomplex im Gegensatz zum freien 2.3-DPG nicht an Hämoglobin gebunden wird und es wurde die Auswirkung dieser Tatsache auf die Sauerstoffbindung des Hämoglobins in Gegenwart von 2.3-DPG und Magnesium untersucht.

c) Hexokinase wurde aus Erythrozyten gewonnen und gereinigt.

d) Der Einfluß von 2.3-DPG und Magnesium auf die Aktivität von Hefe- und Erythrozytenhexokinase wurde untersucht und dabei gefunden, daß bei den in den Erythrozyten herrschenden Konzentrationsverhältnissen die Aktivität der Hexokinase besonders stark von geringen Änderungen der 2.3-DPG- und Magnesiumkonzentration beeinflußt wird. Die Bedeutung dieser Ergebnisse für die Regulation der 2.3-DPG-Konzentration in den Erythrozyten und ihre Auswirkung auf die Sauerstoffbindung des Hämoglobins wurde diskutiert.

5.2. Ergebnisse der Untersuchungen über die Wirkung von Adenosin-3'-5'-monophosphat (cycl. AMP):

a) Es konnten durch wiederholte Elektrofokussierung zwei Isoenzyme der Carboanhydrase aus Hühnernieren weitgehend getrennt werden. Sie besitzen die isoelektrischen Punkte 6, 79 und 6, 93.

b) Die Aktivität von Carboanhydrase in Nierenhomogenaten konnte durch Inkubation mit ATP und Magnesium durch Zusatz von cycl. AMP um ca. 15 % gesteigert werden.

c) Nach Zusatz des Isoenzyms mit dem isoelektrischen Punkt 6, 93 wurde bei der Inkubation sogar eine Aktivierung um 50 % beobachtet. Die Aktivität des Isoenzyms mit dem isoelektrischen Punkt 6, 79 blieb bei diesen Versuchsbedingungen konstant.

d) Aus den Versuchsergebnissen wird geschlossen, daß das Isoenzym mit dem isoelektrischen Punkt 6, 79 die durch Phosphorylierung entstandene aktivere Form des anderen Isoenzyms ist.

e) Befunde von Siegmund und Holke, daß eine Aktivierung der Nierencarboanhydrase bei Hühnern durch Parathormon ausgelöst und durch cycl. AMP vermittelt wird, konnten durch diese Versuche in ihrem Mechanismus weiter aufgeklärt werden.

6. Experimenteller Teil

6.1. Hochspannungselektrophorese von 2.3-DPG

Als Träger wird ein Filterpapierstreifen (Whatman Nr. 1 oder Nr. 3 MM) benutzt, der nach den Angaben von Heald (73) nacheinander mit 1 N Salzsäure, 0,5 %iger EDTA-Lösung in 1 N Ammoniumhydroxid, 1 N Salzsäure, 1 N Essigsäure und schließlich mit dest. Wasser gewaschen wurde. Er befindet sich zwischen einem von Kühlwasser durchflossenen Kunststoffkasten und einer Glasplatte.
Zur Stromzuführung dienen zwei Flüssigkeitsheber, deren eines Ende in ein Becherglas taucht, das die Elektrolytlösung - 2 N Ameisensäure - enthält und deren anderes Ende über eine Glasfritte und elektrolytgetränktes Filterpapier (74) die Verbindung zum Elektrophoresestreifen herstellt. Zur Stromzuführung tauchen Graphitstäbe in die beiden Bechergläser. Nach dem punktförmigen Auftragen der 2.3-DPG-Lösung wird die Elektrophorese 2 Stunden bei 1100 V laufen gelassen. Der Papierstreifen wird bei 80° C getrocknet, mit einer 0,25%igen Lösung von Ammoniummolybdat in 1 N Schwefelsäure besprüht, erneut getrocknet und durch Bestrahlen mit einer UV-Lampe entwickelt (73).

6.2. Überführung des 2.3-DPG-Cyclohexylammoniumsalzes in die freie Säure

100 mg des käuflichen Cyclohexylammoniumsalzes werden in 1 ml bidest. Wasser gelöst und auf eine Kationenaustauschersäule von 30 cm Länge und 2 cm Durchmesser mit Permutit RS (H^+- Form) aufgegeben. Das Permutit wurde zuvor durch Auskochen mit bidest. Wasser und Waschen in der Säule gereinigt. Nach dem Eluieren mit bidest. Wasser erhält man ca. 13 ml der freien Säure, die etwa 7 mM ist. Zur Konzentrationsbestimmung werden 2 ml mit 0,1 N NaOH potentiometrisch titriert. Der Austauscher wird mit halbkonzentrierter Salzsäure regeneriert und mit dest. Wasser neutral gewaschen.

6.3. pH-Titrationskurven

Die pH-Titrationskurven werden mit dem Kompensations-Potentiometer Modell PH-Meter 4 der Fa. Radiometer aufgenommen, das eine Ablesung auf 0,001 zwischen den pH-Werten 0 und 12 erlaubt. Von der gleichen Firma stammen auch die Elektroden mit Spezialhalterungen, und zwar die Glaselektrode G 200 B und die gesättigte Kalomelelektrode K 100, die ohne Diaphragma arbeitet.

Das Gerät wird wie üblich mit zwei Eichpuffern geeicht. Zur Prüfung über den gesamten interessierenden pH-Bereich werden vor jeder Messreihe außerdem 10 ml 0,1 M Kaliumdihydrogenphosphat mit 2 N Natronlauge titriert und die gewonnenen Werte mit der berechneten Pufferkurve verglichen.

Passend zur Halterung am Gerät wurde ein doppelwandiges Gefäß angefertigt, das es erlaubt, den Titrationsansatz mit Hilfe eines Umlaufthermostaten auf einer konstanten Temperatur von 25,0 $^{\circ}$ C zu halten. Hierin werden jeweils 10 ml einer ca. 1 mM Lösung der freien Säure des 2.3-DPG in 0,1 M Kaliumchlorid bzw. Tetramethylammoniumbromid mit 0,1 N Kaliumhydroxid- bzw. 0,1 N Tetramethylammoniumhydroxidlösung in Schritten von 10 µl titriert. Die Zuführung des Titrationsmittels erfolgt mit Hilfe der Digitalbürette DV 11 mit 1 ml Aufsatz der Fa. Mettler durch einen Polyäthylen-Kapillarschlauch, der während der gesamten Titration in die Lösung getaucht bleibt. Um Störungen durch Kohlendioxid der Luft möglichst auszuschalten, wird die Lösung durch einen weiteren Kapillarschlauch mit gereinigtem Stickstoff durchströmt. Mit einem kleinen, elektrisch angetriebenen Rührer wird für gute Durchmischung gesorgt.

Bei der Aufnahme der Überschußkurven sind die Lösungen außerdem 0,01 M an Magnesiumchlorid, Calciumchlorid bzw. Strontiumnitrat.

6.4. Bestimmung der Reaktionswärmen bei der Komplexbildung von 2.3-DPG mit Erdalkalichloriden

Die Reaktionswärmen werden im Microcalorimeter Modell 190 B mit "optional environmental temperature control" der Fa. Beckman bestimmt. Zur leichteren Auswertung der Ergebnisse besitzt der µV-Schreiber einen Disc-Chart-Integrator.

Es werden Reaktionsgefäße (Abb. 7) von 15 ml Inhalt aus Glas benutzt, die zwei kleine Einbuchtungen zur getrennten Aufnahme des zweiten Reaktionspartners (maximal je 300 µl) besitzen.

Zur Eichung des Gerätes dient die Neutralisationswärme einer bekannten Menge Salzsäure. Hierzu bereitet man mit ausgekochtem bidest. Wasser 0,1 mM Natriumchloridlösung und verdünnt damit aus Fixanallösungen Salzsäure und Natronlauge auf 0,01 N. Zwei Kalorimetergefäße werden mit "cell seal", einem Schmiermittel, das eine besonders gute Wärmeleitfähigkeit besitzt, leicht eingefettet. Mit einer kalibrierten Spritze, die mit einem dünnen Polyäthylenschlauch verbunden ist, wird das Reaktionsgefäß mit 15 ml 0,01 N Natronlauge und das Vergleichsgefäß mit 15 ml 0,1 mM Natriumchloridlösung gefüllt. Jeweils in eine der Einbuchtungen beider Kalorimetergefäße werden aus einer Micropipette (Beckman) nun 200 µl 0,01 N Salzsäure gefüllt. (Diese Micropipetten zeichnen sich durch eine außerordentlich gute Reproduzierbarkeit aus. Ihre Abweichung vom Sollwert lag bei mehreren Nachprüfungen bei 0,25 %). Nach dem Verschließen der Einfüllöffnungen mit kleinen Kunststoffstopfen werden die Gefäße vorsichtig in die Bohrungen des Thermopiles gesteckt und Temperaturausgleich abgewartet. Wenn dieser eingetreten ist, wird eine gerade Null-Linie geschrieben. Die Reaktion wird durch Drehen des mit den Kalorimetergefäßen beschickten Thermopiles gestartet und zwar 180° im Uhrzeigersinn und zurück und 180° entgegen dem Uhrzeigersinn und zurück, was am "mixing programmer" des Gerätes durch folgende Einstellung vorgewählt werden kann: 180° CW (clock wise), 0° CCW (counter clock wise), 180° CCW, 0° CW. Das Mischen wird

nach Ablauf der Reaktion noch dreimal wiederholt. Dabei entstehen sehr kleine Schreiberausschläge. Die entsprechenden Integratoreinheiten werden von den bei der Reaktion gemessenen abgezogen.

Zur Reinigung werden die Kalorimetergefäße außen mit Alkohol gewaschen, mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe entleert, gespült und 30 Minuten lang in Dichromat-Schwefelsäure gestellt. Nach sorgfältigem Spülen - sie sollen jetzt nur noch mit Neoprene- oder Polyäthylenhandschuhen angefaßt werden - werden die Gefäße im Trockenschrank getrocknet.

Zur Messung der Komplexbildungs-Enthalpien wird das Reaktionsgefäß mit 10 ml einer 0,01 M Lösung der entsprechenden Erdalkalichloride in 0,1 M Kaliumchlorid bzw. Tetramethylammoniumbromid beschickt. In die Einbuchtungen werden zweimal 250 µl 8 mM 2.3-DPG-Lösung gegeben, die ebenfalls 0,1 M an Kaliumchlorid bzw. Tetramethylammoniumbromid ist. Die Freie Säure (vgl. Abschnitt 6.2.) wird zuvor mit 0,1 M Kalilauge bzw. Tetramethylammoniumhydroxidlösung in das Salz überführt. Das Vergleichsgefäß wird bis auf die Erdalkalichloride genau wie das Reaktionsgefäß beschickt. Die Messung erfolgt wie unter "Eichung" beschrieben.

6.5. Von Phosphatverbindungen freie Hämoglobinlösung

Die Vorschrift folgt den Angaben von Benesch et al. (6). 30 ml Humanblut werden in einem Zentrifugenglas aufgefangen, das 6 ml einer 3,2 %igen Natriumcitratlösung enthält. Die Erythrozyten werden abzentrifugiert (10 Minuten bei 1700 g) und an der Zentrifuge dreimal mit eiskalter 0,9 %iger Natriumchloridlösung gewaschen. Dann wird drei Minuten lang mit 1 Vol. bidest. Wasser und 0,4 Vol. Toluol geschüttelt und nach Zentrifugieren das Hämolysat zwischen Zellmembranen und Toluolschicht mit einer Pipette abgezogen. Das Hämolysat, jedoch nicht mehr als 15 ml, wird über eine Chromatographiesäule von 2 cm Durchmesser und 60 cm Länge mit Sephadex G 25 gegeben, die mit 0,1 M Natriumchloridlösung äquilibriert wurde. Die Durch-

laufgeschwindigkeit beträgt dabei 20 - 25 ml pro Stunde. Die Säule ist mit einem Kühlmantel ausgestattet und wird auf ca. 3^{o} C gehalten. Ihr Ablaufschlauch führt in eine Kühltruhe. im Eluat wird die Konzentration an Hämoglobin und Phosphat bestimmt. Die Sephadex-Säule wird zur Aufbewahrung mit einer Natriumchloridlösung gespült, die 20 mg Natriumazid in 100 ml enthält.

6.6. Hämoglobinbestimmung

20 µl des Hämolysats werden in ein Reagenzglas mit 5 ml Cyanid-Ferricyanid-Bicarbonat-Reagenz gegeben.

(200 mg Kaliumhexacyanoferrat-III, 50 mg Kaliumcyanid und 1 g Natriumhydrogencarbonat pro Liter Lösung)

Es wird gut umgeschüttelt und nach 20 Minuten die Extinktion in einer 1 cm Küvette gegen eine mit Reagenz gefüllte Küvette bei 546 nm im Photometer Eppendorf gemessen.

Zur Berechnung wird der molare Extinktionskoeffizient des Cyanidhämiglobins $\varepsilon_{546} = 44 \cdot 10^{6}$ cm^{2}/Mol benutzt und ein Molekulargewicht von 68 000 angenommen.

6.7. Gesamtphosphatbestimmung

(einschließlich des schwer hydrolysierbaren 2.3-DPG)

Zur Bestimmung des gesamten Phosphors wird die Methode von Bartlett (35) leicht modifiziert benutzt. Hierzu wird 1 ml der Probe mit

0,3 ml 10,5 N $HClO_4$ in einem Sandbad bei 180-190° C 60 Minuten lang verascht. Anschließend werden

1 ml 1 N NaOH,

0,1 ml 3%iges Ammoniummolybdat und

0,1 ml 10%ige Ascorbinsäure dazugegeben.

Nach gutem Mischen erwärmt man 7 Minuten lang in einem Wasserbad auf 100^{o} C und mißt nach dem Abkühlen in einer 1 cm Mikroküvette die

Extinktion im Spektralphotometer bei 820 nm.
0,1 µg P entsprechen einer Extinktion von 0,060.

6.8. Gleichgewichtsdialyse

Ein Dialysierschlauch (Visking, Typ 8/32) von ca. 15 cm Länge wird mit einer Lösung gefüllt, die 10 mM an Bis-Tris-Puffer vom pH 7,4, 0,5 mM an 2.3-DPG und 0,5 mM an Magnesiumchlorid ist. Zur späteren Durchmischung wird in den Dialysierschlauch auch eine kleine Glasperle gegeben. Der verschlossene Schlauch wird in ein Reagenzglas mit Schliff gebracht, das mit einer Lösung aufgefüllt wird, die 10 mM an Bis-Tris-Puffer (pH 7,4), 0,5 mM an Hämoglobin, 0,5 mM an 2.3-DPG und 0,5 mM an Magnesiumchlorid ist (Abb. 9). In beiden Lösungen werden zur Kontrolle die Konzentrationen von 2.3-DPG und Magnesium bestimmt. Das Reagenzglas wird mit einem Dreiweghahn verbunden und nach Kühlung in einem Eisbad mit Hilfe einer Vakuumpumpe (Leybold Minipumpe) evakuiert. Danach wird durch den anderen Anschluß nachgereinigter Stickstoff aus einem Gummiballon in die Apparatur gelassen. Dieser Vorgang wird mehrmals wiederholt, wobei auf gutes Durchmischen zwischen den Arbeitsgängen zu achten ist. Unter gelegentlichem Mischen bleibt die Dialyseanordnung eine Woche lang in der Kühlkammer bei 0° C stehen.

Zur komplexometrischen Magnesiumtitration werden 0,25 ml der beiden Lösungen eingesetzt. Vor der Bestimmung im Atomabsorptions-Spektrophotometer sind die Lösungen 1 : 10 mit bidest. Wasser zu verdünnen.

Für die Bestimmung von 2.3-DPG wird jeweils 1 ml der dialysierten Lösung mit 1 ml 0,6 M Perchlorsäure versetzt, der Niederschlag abzentrifugiert und überschüssige Perchlorsäure in 1 ml des Zentrifugats mit 0,3 ml 1 N KOH gefällt. Je nach Konzentration werden 10 µl oder 20 µl des Überstandes zur Bestimmung von 2.3-DPG eingesetzt.

6.9. Komplexometrische Magnesiumtitration

In eine Küvette mit 4 cm Schichtdicke werden pipetiert:
9,5 ml bidest. Wasser,
2,0 ml 0,88 M Ammoniakpuffer pH 10 (0,75 g Ammoniumchlorid und 5,7 ml 25 %ige Ammoniumhydroxidlösung werden in bidest. Wasser gelöst, mit 0,1 N Salzsäure auf pH 10 eingestellt und auf 100 ml aufgefüllt),
0,01 ml einer 1%igen Lösung von Metallphthalein in Äthanol und
0,25 ml der zu untersuchenden Lösung.
Es wird mit 1 mM trans-1.2-Diaminocyclohexan-N.N.N'N'-tetraessigsäure titriert (34,6 mg und 4 ml 0,1 N NaOH werden auf 100 ml gelöst). Die Zugabe des Titrationsmittels erfolgt mit Hilfe des Mikrodosimeters der Fa. Ingold in Schritten von 20 µl durch einen Kapillarschlauch, der in die Küvette taucht. Die Änderung der Extinktion bei 546 nm wird im Photometer Eppendorf verfolgt und der Endpunkt der Titration graphisch ermittelt. Es ist vorteilhaft, den Raum soweit zu verdunkeln, daß man das Photometer während der Titration offen lassen kann.

Zur Titerstellung werden 100 µl 5 mM Magnesiumchlorid titriert. Eine Wiederholung in Gegenwart von 100 µl 5 mM Magnesiumchlorid und 100 µl 5 mM 2.3-DPG zeigt, daß 2.3-DPG bei diesen Konzentrationen keinen Einfluß auf das Ergebnis hat.

6.10. Magnesiumbestimmung im Atom-Absorptions-Spektrophotometer

Für diese Bestimmung stand ein Atom-Absorptions-Spektrophotometer Modell 300 der Fa. Perkin-Elmer zur Verfügung.
Zum Atomisieren dient eine Acetylen/Luft-Flamme, wobei die Druckminderer an den Gasflaschen für Acetylen auf 0,6 atü und für Luft auf 2,1 atü einzustellen sind. Die Regelventile am Gerät werden so

eingestellt, daß die Durchflußmesser für Acetylen 12 Skalenteile und für Luft 13 Skalenteile anzeigen. Als Strahlenquelle dient eine kombinierte Hohlkathodenlampe für die Elemente Calcium und Magnesium. Der Monochromator wird auf die Magnesiumlinie 285,2 nm eingestellt, bei einer Spaltbreite von 2 nm. Die Hohlkathodenlampe wird so justiert, daß eine möglichst große Lichtintensität auf den Monochromator trifft. Die optimale Justierung des Brenners wird während des Versprühens einer nicht zu konzentrierten Magnesiumlösung (hierfür kann z.B. Leitungswasser dienen) durch eine solche Einstellung gefunden, bei der ein möglichst hoher Extinktionswert angezeigt wird. Da die zu messenden Lösungen mit bidest. Wasser angesetzt sind, wird die Nullpunkteinstellung beim Versprühen von bidest. Wasser vorgenommen. Aus einer Magnesium-Fixanallösung werden Verdünnungen hergestellt, die 25, 50 und 75 µM an Magnesium sind und damit eine Eichkurve erstellt. Zwischen den einzelnen Messungen wird immer bidest. Wasser versprüht. Aus den gemessenen Extinktionen ermittelt man mit Hilfe der Eichkurve die gesuchte Magnesiumkonzentration. Die zu untersuchenden Lösungen sind so zu verdünnen, daß ihre Magnesiumkonzentrationen im Bereich der Eichkurve liegen.

Gewisse Schwankungen in der Anzeige, die beim Arbeiten mit der Flamme nie ganz zu vermeiden sind, werden vom Gerät dadurch ausgeglichen, daß eine einstellbare Zeit lang gemessen und dann der Mittelwert ausgegeben wird.

6.11. Bestimmung von 2.3-DPG durch Aktivierung einer eventuellen Phosphataseaktivität der Phosphoglycerat-Mutase

In eine 1 cm Küvette aus optischen Glas oder Quarz werden pipettiert:

3,00 ml 20 mM Imidazol/Salzsäure-Puffer, pH 7,6, der
5 mM an Magnesiumchlorid und
5 mM an Mercaptoäthanol ist,

0,10 ml 1 mM 2.3-DPG,
0,05 ml ca. 7 mM NADH (5 mg/ml),
0,02 ml ca. 40 mM ATP (25 mg/ml),
0,10 ml 10 mM Natriumpyrophosphat bzw. 2-Phosphoglycolat,
0,01 ml 0,3 mg/ml Phosphoglycerat-Kinase
(Verdünnung mit obigem Imidazolpuffer) und
0,01 ml 10 mg/ml Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase.

Nach dem Mischen wird die Extinktion bei 366 nm im Photometer Eppendorf gemessen und ihr Konstantwerden abgewartet. Die Reaktion wird durch Zugabe von
0,01 ml 5 mg/ml Phosphoglycerat-Mutase gestartet und die Extinktion alle 30 Sekunden notiert.

Zur Probe auf die Funktion des Tests wird die Reaktion in Gegenwart von 100 µl einer ca. 1 mM 3-Phosphoglyceratlösung wiederholt.

6.12. Bestimmung von 2.3-DPG als Cofaktor der Phosphoglycerat-Mutase-Reaktion

Gemessen wird die Extinktionsabnahme pro Minute durch Umsetzung von Phosphoenolpyruvat bei 240 nm im Spektralphotometer PMQ II von Zeiss. Die Temperatur der Küvette ist mit Hilfe eines Umlaufthermostaten auf 25° C konstant zu halten. Es wird gegen eine Vergleichsküvette mit dest. Wasser gemessen.

In eine 1 cm Quarzküvette werden pipettiert:
2,60 ml bidest. Wasser,
0,10 ml 0,1 M Tris/Salzsäure-Puffer, pH 7,4,
0,10 ml 22,5 mM Phosphoenolpyruvat, Cyclohexylammoniumsalz,
0,15 ml 0,1 M Magnesiumchlorid,
0,02 ml 2 mg/ml Enolase und
0,02 ml 2 mg/ml Phosphoglycerat-Mutase.

Nach dem Mischen wartet man das Ende bzw. Konstantwerden der "Schleichreaktion" ab und startet die Reaktion durch Zugabe von 0,01 ml der Probe (etwa 0,1 mM 2.3-DPG).

Für die Anfertigung einer Eichkurve werden 5, 10 , 15 und 20 µl einer 0,1 mM 2.3-DPG-Lösung eingesetzt und die Menge an bidest. Wasser so gewählt, daß das Ansatzvolumen immer 3,00 ml beträgt.

6.13. Sauerstoffbindungskurven

Ein Tonometergefäß (Abb. 15) wird mit
0,5 ml 0,2 mM Hämoglobinlösung in 0,1 M Natriumchlorid,
1,0 ml 1 mM 2.3-DPG in 20 mM Bis-Tris/Salzsäure-Puffer, pH 7,4, der 0,1 M an Natriumchlorid ist und
1,0 ml 0,1 M Natriumchloridlösung, die 0; 2,5; 25 oder 50 mM an Magnesiumchlorid ist, beschickt.

Zur Aufnahme der Bindungskurve des reinen Hämoglobins enthält ein Ansatz weder 2.3-DPG noch Magnesiumchlorid.

Das Tonometer wird in Eis gestellt und für fünf Minuten mit einer Vakuumpumpe (Minipumpe von Leybold) verbunden. Danach wird es - fast waagerecht liegend - in einem Wasserbad von 25° C um seine Längsachse gedreht. Der Vorgang wird noch einmal wiederholt.
Im registrierenden Spektralphotometer Modell Acta V von Beckman wird das Spektrum zwischen 500 und 600 nm aufgenommen (Abb. 14), wobei folgende Einstellung gewählt wird: Vortrieb (Wellenlängenänderung): 0,2 nm/sec., Papiervorschub (das bedeutet hier Koppelung mit dem Wellenlängenantrieb) : 0,1 inch/nm (Geräte-Einstellung 10 nm/inch, ca. 4 nm/cm), Spreizung: Vollausschlag bei E = 3,0, Dämpfung: slow, Spalt: 0,25 mm.
Das Tonometer wird nun mit einer 1 ml Messpipette verbunden, in der sich ein Tropfen Quecksilber befindet. Durch vorsichtiges Öffnen des Hahnes unter Beobachtung des Quecksilbertropfens läßt man 0,05 ml Luft in das Tonometer. Um Gleichgewichtseinstellung zu erreichen, wird es wieder 10 Minuten lang im Wasserbad gedreht und anschliessend das Spektrum aufgenommen. Dann werden weitere 0,05 ml Luft zugegeben und wie oben verfahren. Das wird mehrere Male wiederholt und schließlich auch bei vollständiger Füllung des Tonome-

ters mit Luft. Die Spektren eines Ansatzes können mit der Einrichtung zur wiederholten Registrierung, die das Photometer besitzt, genau übereinander geschrieben werden.

Die Extinktionen der Maxima sind ein Maß für den Grad der Sauerstoffsättigung des Hämoglobins.

6.14. Einfluß von Citrat und 2.3-DPG auf die Aktivität von Hefehexokinase bei verschiedenen Magnesiumkonzentrationen

An die Hexokinasereaktion wird als Indikatorreaktion die Oxidation von Glucose-6-phosphat durch Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase angeschlossen. Die dabei gebildete Menge an NADPH wird durch Messen der Extinktion bei 366 nm ermittelt. Der Küvettenhalter des Photometers Eppendorf wird mit einem Umlaufthermostaten auf 25° C temperiert. Man pipettiert in eine Küvette aus Quarz oder optischen Glas:

1,27 ml 0,05 M Triäthanolamin/Salzsäure-Puffer, pH 7,6,
1,20 ml 100 mg/ml Glucose in obigem Puffer, der 0,1 M an Mercaptoäthanol ist,
0,20 ml 0,1 M Magnesiumchlorid,
0,20 ml 10 mg/ml NADP, Natriumsalz,
0,10 ml 10 mg/ml ATP, Natriumsalz,
0,01 ml 1 mg/ml Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
und startet die Reaktion durch Zugabe von
0,02 ml 50 µg/ml Hexokinase in 10 mg/ml Glucoselösung, die 10 mM an Mercaptoäthanol ist.

Die Extinktion wird alle 30 Sekunden abgelesen, in ein Diagramm übertragen und daraus die Enzymaktivität berechnet.

Bei der Bestimmung in Gegenwart eines Citrat/Magnesium- und 2.3-DPG/Magnesium-Puffers wird gleichzeitig immer ein Kontrollansatz wie oben gemessen, um die Hexokinaseaktivitäten vergleichen zu können.

Citrat/Magnesium-Puffer:
In jeden Ansatz kommen 0,3 ml einer Lösung von 4,203 g (0,02 Mol) Citronensäure-monohydrat in 100 ml bidest. Wasser, die mit KOH auf pH 7,6 eingestellt ist und
für pMg=2 0,73 ml 0,1 M Magnesiumchlorid,
für pMg=3 0,40 ml 0,1 M Magnesiumchlorid sowie
für pMg=4 0,085 ml 0,1 M Magnesiumchlorid.

Das Puffervolumen wird so variiert, daß das Ansatzvolumen immer 3 ml beträgt.

2.3-DPG/Magnesium-Puffer:

Jeweils soviele ml einer 2.3-DPG-Lösung (freie Säure), wie 60 µMol entsprechen werden auf pH 7,4 eingestellt, gefriergetrocknet und bei Bedarf in der nötigen Menge (1,47 ml minus Volumen der Magnesiumchloridlösung) 0,05 M Triäthanolamin/Salzsäure-Puffer gelöst. Es werden
für pMg=2 0,80 ml 0,1 M Magnesiumchlorid,
für pMg=3 0,23 ml 0,1 M Magnesiumchlorid und
für pMg=4 0,06 ml 0,1 M Magnesiumchlorid zum Bestimmungsansatz gegeben.

Alle anderen Lösungsmengen und Konzentrationen bleiben gegenüber der obigen Vorschrift unverändert.

6.15. Hämatologische Methoden (75)

Erythrozytenzählung: In eine Mischpipette zur Erythrozytenzählung wird Blut bis zur Marke 0,5 aufgezogen. Durch Nachziehen von Hayems Reagenz (0,25 g Quecksilber(II)chlorid, 2,5 g Natriumsulfat und 0,5 g Natriumchlorid werden zu 100 ml in dest. Wasser gelöst) bis zur Marke 101 entsteht eine 200fache Verdünnung. Es wird ein bis zwei Minuten lang geschüttelt, eine Zählkammer nach Schilling damit gefüllt und die Erythrozyten in fünf mittleren Quadraten werden

unter dem Mikroskop gezählt. Das Ergebnis in Erythrozyten pro µl erhält man durch Multiplikation der Summe der gezählten Blutkörperchen mit 10 000.

Retikulozytenzählung: Auf einem Uhrglas werden 0,5 ml Blut mit 0,5 ml einer Lösung von 1 g Brillantkresylblau in 100 ml physiologischer Kochsalzlösung verrührt und für 20 - 30 Minuten in eine mit feuchtem Filterpapier ausgelegte Petrischale gestellt. Ein Tropfen wird auf einem fettfreien Objektträger ausgestrichen und an der Luft trocknen lassen. Mikroskopiert wird mit Ölimmersion. Es werden die auf 1000 Erythrozyten entfallenden Retikulozyten gezählt, die an der Färbung des Kerns zu erkennen sind.

Hämatokrit: Heparinisiertes Blut wird mit einer Kanüle bis zur Marke 100 in spezielle, graduierte Kapillarröhrchen (Hämatokritröhrchen) gefüllt, 15 Minuten lang bei 3 000 g zentrifugiert und das Erythrozytenvolumen an der Skala in % abgelesen.

6.16. Hexokinase aus Kaninchen-Erythrozyten

Kaninchenblut wird durch Punktion der Ohrartherie mit einer sterilen Einmalkanüle Nr. 1 (0,9 x 38 mm) gewonnen und in Zentrifugengläsern aufgefangen, die Heparin als Antikoagulans enthalten. Von 3 kg schweren Kaninchen können unbedenklich 30 ml Blut abgenommen werden. Das Blut wird sofort mit Eis gekühlt; auch die gesamte Aufarbeitung wird bei 3-4° C vorgenommen. Die Erythrozyten werden in der Servall Kühlzentrifuge RC-2 während 10 Minuten bei 8 000 g vom Plasma getrennt und an der Zentrifuge dreimal mit eiskalter physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Zum Hämolysieren werden die gewaschenen Erythrozyten in dem gleichen Volumen 0,01 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0, der 2,7 mM an EDTA, 7,5 mM an Mercaptoäthanol und 10 mM an Glucose ist, suspendiert und eingefroren. (Dieser Puffer wird auch für die weitere Aufarbeitung benutzt).

Nach dem Auftauen wird zentrifugiert und das Hämolysat - aus 100 ml Blut gewinnt man 50 bis 60 ml - vorsichtig abgezogen, da die Zellfragmente schlecht pelletieren. 30 ml des Hämolysats werden mit einer Pumpgeschwindigkeit von 40 ml pro Stunde über eine gekühlte Chromatographiesäule von 30 mm Durchmesser und 550 mm Länge mit Sephadex G 25 gegeben, die mit dem 0,01 M Kaliumphosphatpuffer equilibriert wurde. Eine Chromatographiesäule von 20 mm Durchmesser und 300 mm Länge wird etwa 200 mm hoch mit gereinigter DEAE-Cellulose gepackt. (Dazu wurden 30 g DEAE-Cellulose SS von Serva eine halbe Stunde lang mit 0,5 N Salzsäure gerührt und mit dest. Wasser gewaschen bis das Wasser einen pH-Wert von 4-5 hatte. Darauf wurde mit 0,5 N Natronlauge eine halbe Stunde lang gerührt und dann so oft mit dest. Wasser bis pH 7-8 erreicht war. Nun wurde mit 0,1 M Phosphatpuffer von pH 7,0 und schließlich mehrmals mit 0,01 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0 gewaschen). Das gesamte, über Sephadex G 25 von niedermolekularen Verbindungen befreite Hämolysat (etwa 100 ml) wird mit ca. 40 ml pro Stunde über die DEAE-Cellulosesäule gepumpt, wobei das Hämoglobin nicht gebunden wird, wohl aber die Hexokinase. Die Säule wird mit 350 ml des 0,01 M Phosphatpuffers, pH 7,0, gespült und mit 450 ml eines Gradienten von 0 bis 0,6 M Kaliumchlorid in 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,0 eluiert. Im UV-Monitor von Serva wird die Extinktion bei 254 nm aufgezeichnet. Es werden Fraktionen von 7,5 ml aufgefangen und diejenigen mit messbarer Extinktion sofort mit Hilfe der pH-Stat-Methode auf Hexokinaseaktivität getestet. Die aktiven Fraktionen werden zusammengeschüttet. Sie werden mit Hilfe einer Ultrafiltrationszelle von Amicon (standard stirred cell, model 52) unter Verwendung einer Diaflo Ultrafiltrationsmembran PM 10 auf ein Zehntel ihres Volumens konzentriert. Dabei ist in der Kühlkammer zu arbeiten. Bei einem Stickstoffdruck von 2 atü können 30 ml der Proteinlösung in einer halben Stunde konzentriert werden.

6.17. Aktivitätsbestimmung von Erythrozyten-Hexokinase im pH-Stat

Der Apparat zur pH-Stat-Messung der Fa. Mettler besteht aus Messverstärker DK 10, Endpunktvorwahlgerät DK 11, E-pX-Converter DK 12 sowie der Digitalbürette DV 11 mit 1 ml Aufsatz und Steuergerät DV 103. Die Elektrodenhalterung mit temperierbarem Titrationsgefäß und Rührmotor Typ M 22a sowie die Glaselektrode B 202 C und die gesättigte Kalomelelektrode K 401 sind Erzeugnisse der Fa. Radiometer. Zur Aufzeichnung des von der Bürette ausgegebenen Analogsignals gegen die Zeit dient ein Schreiber Typ RE 453 von Metrawatt. Das Titrationsmittel wird über eine in die Lösung eintauchende Glaskapillare zugeführt, die mit einem dünnen Polyäthylenschlauch mit der Bürette verbunden ist. Die Bürette enthält je nach Enzymaktivität 0,01 N oder 0,02 N Natronlauge, die jeweils frisch aus einer konzentrierten Maßlösung verdünnt wird.

Die pH-Stat-Titration folgt im wesentlichen den Angaben von Gerber und Mitarbeitern (52). Der Ansatz wird auf 37° C temperiert und die Reaktionsgeschwindigkeit bei pH 7,6 gemessen. In das Titrationsgefäß werden pipettiert:

0,5 ml 25 mM ATP, Natriumsalz,
1,0 ml 0,75 M Kaliumchlorid,
1,0 ml 50 mM Magnesiumchlorid,
1,0 ml bidest. Wasser und
1,5 ml Hämolysat bzw. Enzymlösung.

Mit ca. 0,5 M Natronlauge, die in eine kleine Spritze gefüllt ist, bringt man den pH-Wert des Ansatzes auf ca. 7,6 und stellt dann die Bürette an. Nach fünf Minuten startet man die Reaktion durch Zugabe von
2,0 ml 0,7 M 2-Desoxy-D-glucose.

Eine Reihe von Versuchen wird zur Bestimmung des pH-Optimums der Erythrozytenhexokinase bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt.

Zur Bestimmung des Einflusses von Citrat und 2.3-DPG auf die Aktivität von Hexokinase aus Kaninchenerythrozyten bei verschiedenen Konzentrationen freier (hydratisierter) Magnesiumionen werden statt bidest. Wasser jeweils 1 ml einer 0,14 M bzw. 0,07 M Citrat- oder 2.3-DPG-Lösung eingesetzt und statt der 50 mM Magnesiumchloridlösung die folgenden Mengen und Konzentrationen, wobei die Differenz zu 1 ml mit bidest. Wasser ausgeglichen wird.

20 mM Citrat/Magnesium-Puffer:
Zum Ansatz werden 1 ml 0,14 M Kaliumcitrat gegeben und
für pMg=2 1.01 ml 0,2 M Magnesiumchlorid,
für pMg=3 0,93 ml 0,1 M Magnesiumchlorid und
für pMg=4 0,20 ml 0,1 M Magnesiumchlorid.

10 mM Citrat/Magnesium-Puffer:
Zum Ansatz werden 1 ml 0,07 M Kaliumcitrat gegeben und
für pMg=2 0,71 ml 0,2 M Magnesiumchlorid,
für pMg=3 0,57 ml 0,1 M Magnesiumchlorid und
für pMg=4 0,11 ml 0,1 M Magnesiumchlorid.

20 mM 2.3-DPG/Magnesium-Puffer:
Zum Ansatz werden 1 ml 0,14 M 2.3-DPG gegeben und
für pMg=2 0,95 ml 0,2 M Magnesiumchlorid,
für pMg=3 0,55 ml 0,1 M Magnesiumchlorid und
für pMg=4 0,15 ml 0,1 M Magnesiumchlorid.

10 mM 2.3-DPG/Magnesium-Puffer:
Zum Ansatz werden 1 ml 0,7 M 2.3-DPG gegeben und
für pMg=2 0,71 ml 0,2 M Magnesiumchlorid,
für pMg=3 0,38 ml 0,1 M Magnesiumchlorid und
für pMg=4 0,06 ml 0,1 M Magnesiumchlorid.

Zum Austesten der Fraktionen aus der DEAE-Cellulose Säulenchromatographie wird (aus Kostengründen) D-Glucose als Substrat für Hexokinase verwendet.

6.18. Isoenzyme der Carboanhydrase aus Hühnernieren

Weiße Leghorn Hähnchen von nicht mehr als 1 kg Gewicht, die pelletiertes Futter (Zittrig Universal III) und Wasser ad libidum erhielten, werden nach vorhergehender Betäubung mit 30 mg Nembutal, das als Lösung von 50 mg/ml in die Flügelvene injiziert wird, durch Dekapitation getötet. Nach Eröffnung der Leibeshöhle werden die Eingeweide entfernt und die Nierenlogen freigelegt. Die einzelnen Nierensegmente werden stumpf herauspräpariert und mit Eis gekühlt. Sie werden von eventuell anhaftenden Blutkoagula befreit und Blutgefäße und Harnleiter entfernt. Nach dem Wiegen werden pro Gramm Niere 2 ml eiskalter 20 mM Tris/Schwefelsäure-Puffer vom pH 7,4, der 0,5 M an Saccharose und 3 mM an Magnesiumsulfat ist, zugegeben und unter Eiskühlung eine Minute lang im Homogenisator nach Potter-Elvehjen mit Teflonstempel homogenisiert. Das Homogenat wird 10 Minuten bei 7 000 g zentrifugiert (Servall Kühlzentrifuge RC-2 mit Rotor SS 34 bei 6 500 UpM), der Überstand wird abgenommen, der Bodensatz mit der 0,5 M Saccharoselösung gewaschen und noch einmal zentrifugiert. Beide Überstände werden vereinigt und 100 Minuten lang bei 105 000 g die sogenannte Mikrosomenfraktion abzentrifugiert. (Je nach Volumen im Rotor A1 50 bei 40 000 UpM, oder 42.1 bei 37 000 UpM in der Ultrazentrifuge L 50 von Beckman). Das Zentrifugat wird 24 Stunden lang gegen bidest. Wasser dialysiert, wobei das Wasser einmal gewechselt wird. Entstandene Trübungen werden während 30 Minuten bei 35 000 g abzentrifugiert. Zwischen den einzelnen Zentrifugationen wird die Carboanhydraseaktivität bestimmt.

Zur Gewinnung der Carboanhydrase werden 20 ml der dialysierten Probe der Elektrofokussierung unterworfen. Hierzu werden Elektrofokussiersäulen nach Haglund (58) benutzt, die in der Glasbläser- und Mechaniker-Werkstatt des Instituts angefertigt wurden und wegen der besseren Trennwirkung besonders für wiederholte Elektrofokussierungen das Uniphor Säulenelektrophoresesystem der Fa. LKB.

Als Elektrodenlösung dienen für die untere Elektrode, die als Anode geschaltet ist,, 1 %ige Schwefelsäure, die 40 Gewichtsprozent Saccharose enthält und für die Kathode 1 %ige Äthylendiaminlösung. Die Elektrophoresesäule wird mit einem Saccharosegradienten (40-0 %) gefüllt und zwar mit Hilfe einer Schlauchpumpe von Technicon, die mit zwei Schläuchen, deren einer das doppelte Lumen des zweiten besitzt, ausgestattet ist, sowie kühlbaren Misch- und Vorratsgefäßen. Abb. 38 zeigt diese Anordnung. Die leichte Lösung enthält keine Saccharose, durch sie wird die dichte Lösung, die 40 %ig an Saccharose ist, immer mehr verdünnt. Da die leichte Lösung mit der halben Geschwindigkeit in das Mischgefäß hineingepumpt wird, wie die Mischung zur Säule, werden beide Gefäße gleichmäßig entleert und es entsteht ein linearer Dichtegradient. Die Proteinlösung wird mit der Lösung ohne Saccharose eingefüllt. Beide Lösungen enthalten so viel Ampholine, pH-Bereich 5 - 9, daß sich in der Säule eine Konzentration von 1 % ergibt. (Ist eine erneute Elektrofokussierung vorgesehen, benutzt man beim ersten Mal eine Ampholine-Konzentration von 4 %). Die angelegte Spannung wird so reguliert, daß eine bestimmte säulenabhängige Leistung nicht überschritten wird und bis 1000 bis 1200 V gesteigert. Nach etwa 70 Stunden wird die Säule über ein Durchflußphotometer mit Schreiber in einen gekühlten Fraktionssammler entleert. Die einzelnen Fraktionen (2,5 ml) werden auf Carboanhydraseaktivität getestet, die pH-Werte gemessen und die Ergebnisse in einem Diagramm dargestellt. So lassen sich die Fraktionen erkennen, die bei der erneuten Elektrofokussierung eine eventuelle weitere Auftrennung erfahren könnten. Die zweite Elektrofokussierung wird analog der ersten durchgeführt.

Zur Untersuchung der Wirkung von Parathormon auf die Isoenzyme der Carboanhydrase aus Hühnernieren werden den Hähnchen zwei Stunden vor der Dekapitation 400 USP Parathormon P-20 der Fa. Ely-Lilly in die Flügelvene injiziert und dann wie beschrieben aufgearbeitet.

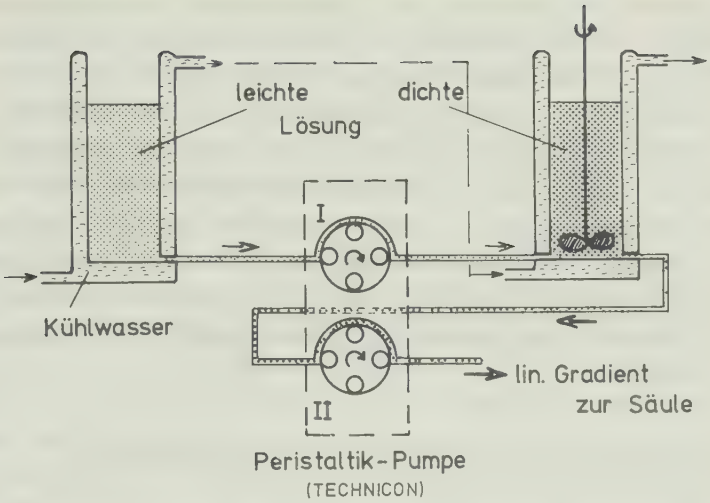


Abb. 38:
Anordnung zur Erzeugung eines linearen Gradienten zur Füllung der Elektrofokussier-Säulen. Die Durchmesser der beiden Pumpenschläuche verhalten sich $d_I : d_{II} = 1 : 2$.

6.19. Aktivitätsbestimmung der Carboanhydrase (vgl. 64)

In ein weites Reagenzglas, das sich in einem Eisbad befindet, pipettiert man

2,0 ml eiskalten 0,022 M Veronal-Natrium-Puffer, pH 8,15, der 5 mg Bromthymolblau in 100 ml enthält,

1,0 ml eiskaltes bidest. Wasser,

2,0 ml einer bei 0° C gesättigten CO_2-Lösung (bidest. Wasser wird bei 0°C mindestens 30 Minuten lang- und auch während der Messung - durch eine Glasfritte mit CO_2 durchströmt)

und mischt kurz.

Mit einer Stoppuhr mißt man die Zeit der unkatalysierten Reaktion (t_o) zwischen der Zugabe der CO_2-Lösung und dem Farbumschlag des Indikators von blau nach grün, der nach Erschöpfung der Pufferkapazität eintritt. Zum besseren Erkennen des Farbumschlages verdünnt man 2 ml des Veronalpuffers mit 3 ml Wasser und stellt die Lösung mit HCl auf pH 6,3 ein. Diese Lösung kommt in ein zweites Reagenzglas, das neben dem zur Messung benutzten angebracht wird. Zur Aktivitätsbestimmung gibt man statt 1 ml Wasser die zu testende Enzymlösung zu bzw. meist eine Verdünnung (etwa o,1 ml Enzymlösung und 0,9 ml Wasser) und stoppt wieder die Zeit (t_x). Die Art der Berechnung sowie die genaue Definition der Enzymeinheiten sind in Abschnitt 4.2. angegeben.

6.20. Bestimmung der Esteraseaktivität der Carboanhydrase

Das Photometer Eppendorf ist hierzu mit einem temperierbaren Küvettenhalter, der auf 25 ^{o} C gehalten wird und mit einem Schreiber mit lin-log-Wandler ausgestattet. Es ist ein Filter von 405 nm eingesetzt. Man benutzt 1 cm Küvetten.

Ansatz:

2,5 ml 20 mM N-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)/Tris-Puffer, pH 7,0 und

0,05 ml 40 mM 2-Hydroxy-5-nitro-α-toluolsulfonsäure-sulton in Acetonitril sowie

0,10 ml Enzymlösung bzw. eine entsprechende Verdünnung.

Aus dem Schreiberdiagramm wird Δ E/Minute entnommen und die Enzymaktivität mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten der 2-Hydroxy-5-nitro-α-toluolsulfonsäure von 7,274 cm^2/Mol berechnet.

6.21. Darstellung von 2-Hydroxy-α-toluolsulfonsäure-sulton

41,3 g (0,4 Mol) Natriumhydrogensulfit und 49,2 g (0,4 Mol) o-Hydroxybenzylalkohol werden in 900 ml bidest. Wasser gelöst und acht Stunden am Rückfluß gekocht. Das Wasser wird am Rotationsverdampfer bis zur völligen Trocknung abgezogen und der Rückstand im Soxhlet-Apparat mit Äthanol extrahiert. Man erhält 78,3 g 2-Hydroxy-α-toluolsulfonsäure, Natriumsalz.
Davon werden 40 g (0,19 Mol) mit 320 g (2,09 Mol) Phosphoroxychlorid versetzt, langsam auf 125° C erhitzt und eine Stunde am Rückfluß gekocht. Das überschüssige Phosphoroxychlorid wird im Vakuum abdestilliert und nach Abkühlen der Rückstand in 600 ml Eiswasser gebracht. Nach vier Stunden saugt man den Niederschlag ab, wäscht mit kaltem Wasser und trocknet.
Nach Umkristallisieren aus Äthanol werden 17,6 g = 54,3 % der Theorie erhalten.

6.22. Darstellung von 2-Hydroxy-5-nitro-α-toluolsulfonsäure-sulton

6,6 g (39 mMol) 2-Hydroxy-α-toluolsulfonsäure-sulton werden in 55 ml konz. Schwefelsäure gelöst. Unter Kühlen im Eisbad und Rühren gibt man über einen Zeitraum von 40 Minuten 3 ml (47 mMol) einer 70 %igen Salpetersäure zu. Nach weiteren 10 Minuten gibt man kleine Eisstücke in die Lösung, bis sich kein Präzipitat mehr bildet, saugt ab und trocknet.
Nach Umkristallisieren aus Äthanol werden 7,8 g = 93 % der theoretischen Ausbeute erhalten.
Fp. 142 - 143° C (Lit. (61): 148,5 - 149,5° C)

6.23. Aktivierung der Carboanhydrase in Nierenhomogenaten von Hühnern

Die Entnahme der Nieren erfolgt wie unter Abschnitt 6.18. beschrieben. Sie werden mit der drei- bis vierfachen Menge Puffer homogenisiert und zentrifugiert. Die Homogenate werden in 25 ml Erlenmeyerkölbchen in einem Schüttelwasserbad bei 30 oder 20° C mit Pufferlösungen inkubiert, die cycl. AMP und ATP enthalten. Meist werden Vergleichswerte ohne cycl. AMP nebenher bestimmt. Zu den angegebenen Zeiten werden Proben von 100 µl entnommen, sofort in vorbereitete Probengläser mit 0,9 ml eiskaltem bidest. Wasser gegeben und die Carboanhydraseaktivität sowie in einigen Fällen parallel dazu die Esteraseaktivität bestimmt. Die genauen Zusammensetzungen der Inkubationsmedien sind in den zugehörigen Abbildungen 30 bis 36 angegeben.

6.24. Aktivierung der isolierten Isoenzyme der Hühnernieren-Carboanhydrase

Hühnernierenhomogenat, das eine Proteinkinaseaktivität besitzt, wird durch Homogenisieren einer frisch entnommenen Niere (vgl. Abschnitt 6.18.) mit dem dreifachen Volumen 0,33 M Saccharoselösung und 20 Minuten langes Zentrifugieren bei 11 000 g gewonnen. Im Schüttelwasserbad wird jede der beiden Carboanhydrase-Banden in einem Reaktionsansatz inkubiert, der folgende Lösungen enthält:

0,5 ml Carboanhydrase-Lösung (isolierte Bande aus der Elektrofokussierung),
0,5 ml 0,1 M N-Morpholinopropansulfonsäure-Puffer, pH 7,8,
0,1 ml frisches Nierenhomogenat,
0,2 ml 10 mM ATP und
0,1 ml 20 mM Magnesiumchloridlösung.

Alle 2, 5 Minuten werden Proben von 10 µl bzw. 50 µl, je nach Carboanhydraseaktivität, entnommen und durch Messung der Geschwindigkeit der CO_2-Hydratation getestet.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. I. Greenwald, J. Biol. Chem. 63, 339 (1925)
2. S. Rapoport und J. Lübering, J. Biol. Chem. 189, 683 (1951)
3. S. Rapoport und C. Nieradt, Biochem. Z. 326, 231 (1955)
4. R. Benesch und R. E. Benesch, Biochem. Biophys. Res. Commun. 26, 162 (1967)
5. A. Chanutin und R. Curnish, Arch. Biochem. Biophys. 121, 96 (1967)
6. R. Benesch et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 59, 526 (1968)
7. C. Lenfant et al., J. Clin. Invest. 47, 2652 (1968)
8. S. Rapoport, Essays Biochem. 4, 69 (1968)
9. R. G. Chapman et al., J. Clin. Invest. 41, 1249 (1962)
10. R. B. Pennell in "The Red Blood Cell", Academ. Press, New York (1964), S. 26
11. C. -H. de Verdier und L. Garby, Scand. J. Haematol. 2, 305 (1965)
12. G. J. Brewer, Biochem. Biophys. Acta 192, 157 (1969)
13. H. F. Bunn et al., J. Biol. Chem. 246, 5273 (1971)
14. A. Chanutin und E. Herman, Arch. Biochem. Biophys. 131, 180 (1969)
15. L. Garby et al., Eur. J. Biochem. 10, 110 (1969)
16. M. F. Perutz, Nature 228, 726 (1970)
17. T. W. Rall et al., J. Biol. Chem. 224, 463 (1957)
18. D. Lipkin et al., J. Amer. Chem. Soc. 81, 6075 und 6198 (1959)
19. E. W. Sutherland und G. A. Robison, Pharmacol. Rev. 18, 145 (1966)
20. E. W. Sutherland, Science 177, 401 (1972)
21. P. Siegmund, Habilitationsschrift, Freie Universität, Berlin (1962)
22. P. Siegmund, Z. klin. Chem. 1, 97 (1963)
23. M. Holke und P. Siegmund, Kurzreferat Nr. 690, 7. FEBS-Kongreß, Varna (1971)
24. M. Holke, Dissertation, Freie Universität, Berlin (1973)
25. S. Wolf, Z. analyt. Chem. 250, 13 (1970)
26. G. Schwarzenbach, Helv. Chim. Acta 33, 947 (1950)
27. P. Dietsch und P. Siegmund, Kurzreferat Nr. 110, 7. FEBS-Kongreß, Varna (1971)
28. P. Dietsch und P. Siegmund, Z. Naturforsch. 27b, 509 (1972)

29. I. A. Rose, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 61, 1079 (1968)

30. H. B. Collier und A. Lam, Biochim. Biophysica Acta (Amsterdam) 222, 299 (1971)

31. G. Schwarzenbach und H. Flaschka, "Die komplexometrische Titration", F. Enke Verlag, Stuttgart(1965)

32. W. Achilles et al., Acta biol. med. germ. 29, 531 (1972)

33. G. Schwarzenbach, Helv. Chim. Acta 35, 2344 (1952)

34. G. Anderegg, Helv. Chim. Acta 48, 1712 (1965)

35. G. R. Bartlett, J. Biol. Chem. 234, 466 (1959)

36. Z. B. Rose und J. Liebowitz, Analyt. Biochem. 35, 177 (1970)

37. J. Krimsky in H. U. Bergmeyer "Methoden der enzymatischen Analyse", Verlag Chemie, Weinheim (1970), S. 1379

38. R. Benesch et al., Analyt. Biochem. 11, 81 (1965)

39. A. Rossi-Fanelli und E. Antonini, Arch. Biochem. Biophys. 77, 478 (1958)

40. R. E. Benesch und R. Benesch, Federation Proceedings 29, 1101 (1970)

41. R. E. Benesch et al., Biochem. 8, 2567 (1969)

42. E. Beutler, Nature New Biol. 232, 20 (1971)

43. K. Uyeda u. E. Racker, J. Biol. Chem. 240, 4682 (1965)

44. L. Grossbard u. R. T. Schimke, J. Biol. Chem. 241, 3546 (1966)

45. M. R. Weiser et al., J. Biol. Chem. 246, 2331 (1971)

46. J. S. Easterby u. M. J. O'Brien, Eur. J. Biochem. 38, 201 (1973)

47. M. A. Hennesey et al., J. Clin. Invest. 41, 1257 (1962)

48. G. R. Bartlett in G. J. Brewer "Red Cell Metabolism and Function" Plenum Press, New York - London (1970), S. 245

49. E. Goetze et al., Biochem. Z. 326, 48 (1954)

50. E. Goetze und S. Rapoport, Biochem. Z. 326, 53 (1954)

51. S. Rapoport "Medizinische Biochemie", VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin (1969), S. 616

52. G. K. G. Gerber et al., Eur. J. Biochem. 17, 445 (1970)

53. A. E. Martell u. G. Schwarzenbach, Helv. Chim. Acta 39, 653 (1956)

54. P. Siegmund et al., Horm. Metab. Res. 6, 158 (1974)

55. L. R. Chase u. G. D. Aurbach, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 58, 518 (1967)

56. L. R. Chase u. G. D. Aurbach, Science 159, 545 (1968)
57. G. L. Melson et al., Endocrinol. 86, 511 (1970)
58. H. Haglund in "Methods of Biochemical Analysis" 19, 1 (1971)
59. F. J. W. Roughton u. V. H. Booth, Biochem. Z. 40, 319 (1946)
60. K. M. Wilbur u. N. G. Anderson, J. Biol. Chem. 176, 147 (1948)
61. K. -W. Lo u. E. T. Kaiser, Chem. Commun. 1966, 834
62. E. T. Kaiser u. K. -W. Lo, J. Amer. Chem. Soc. 91, 4912 (1969)
63. R. W. Butcher u. E. W. Sutherland, J. Biol. Chem. 237, 1244 (1962)
64. P. Siegmund et al., "Praktikum der physiologischen Chemie", Verlag Walter de Gruyter, Berlin (1970)
65. Th. Günter, Habilitationsschrift, Freie Universität, Berlin (1966)
66. R. Mulhausen et al., J. Clin. Lab. Invest. 19, 291 (1967)
67. J. Metcalfe et al., Circulation Res. 25, 47 (1969)
68. C. Lenfant et al., Respir. Physiol. 7, 7 (1969)
69. I. R. Maynard u. J. E. Coleman, J. Biol. Chem. 246, 4455 (1971)
70. G. Schulz et al., Eur. J. Biochem. 24, 7 (1969)
71. O. Vesterberg, Britsh patent No. 1106818 (1968)
72. O. Vesterberg, Acta Chem. Scand. 23, 2653 (1969)
73. P. J. Heald, Biochem. J. 63, 235 (1956)
74. P. Siegmund, DBP Nr. 842 863 (1952)
75. E. Merck, Darmstadt, "Klinisches Labor" (1970)
76. J. McD. Armstrong et al., J. Biol. Chem. 241, 5137 (1966)
77. P. O. Nyman und S. Lindskog, Biochem. Biophys. Acta 85, 141 (1964)
78. S. Chaberek u. A. E. Martell, "Organic Sequestering Agents", J. Wiley, New York (1959)
79. W. D. Wosilait u. E. W. Sutherland, J. Biol. Chem. 218, 469 (1956)
80. K. Bailey, Biochem. J. 36, 121 (1942)
81. G. A. Robison et al., "Cyclc AMP", Academic Press, New York-London (1971), S. 473
82. C. D. Arnaud et al., Ann. Rev. Physiol. 29, 249 (1967)

LEBENSLAUF

Am 18. 7. 1938 wurde ich, Peter Dietsch, in Zeulenroda/Thür. als Sohn des Dipl-Ing. Wilhelm Dietsch und seiner Ehefrau Erika Dietsch, geb. Wauer, geboren.

Ich besuchte von 1944 bis 1952 die Volksschule und spätere Grundschule in Zeulenroda und setzte meine Schulausbildung im Juni 1952 am Friedrich-Ebert-Gymnasium in Berlin-Wilmersdorf fort. Hier legte ich im März 1957 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1957/58 begann ich an der Universität Würzburg das Studium der Chemie, wo ich im Dezember 1961 die Diplom -Chemiker-Vorprüfung bestand. Ab Sommersemester 1962 studierte ich an der Freien Universität Berlin und schloß im August 1966 das Studium mit der Diplom-Prüfung in Chemie ab.

Ich habe dann unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. P. Siegmund am Physiologisch-chemischen Institut und jetzigem Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik der Freien Universität gearbeitet und mich seit 1969 mit dem Thema der vorliegenden Dissertation beschäftigt.

Im Februar 1969 wurde ich mit der Wahrnehmung der Stelle eines Wissenschaftlichen Assistenten beauftragt und habe seither an Praktika der Biochemie mitgearbeitet.